

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE
PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

BIOCHEMISTRY
and BIOTECHNOLOGY
for MODERN MEDICINE

Edited by
Prof. Serhiy Komisarenko

Kyiv - 2013

UDC 577+60-22-61

Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine

Edited by S. Komisarenko. – K.: Publishing
House Moskalenko O. M., 2013, 704 p.

This monograph is to some extent a unique one. It is a collection of articles dedicated to the most important problems in modern biomedical sciences – both fundamental and those related to medical sciences, in particular, to the research in oncology, immunology, endocrinology, diagnostics and therapy of infectious diseases, etc. Most of the authors of the articles are world leaders in relevant Biological sciences – in Biochemistry, Molecular and Cell Biology, Biotechnology, other related sciences. The authors include both world-renowned scientists and young talented researchers. But what unites all principal authors is that all of them are either colleagues, or friends, or coworkers of Professor Serhiy Komisarenko, to whose 70th Anniversary they have dedicated their articles. This monograph is for scientists who work in both fundamental research and in applied biomedical sciences and who are interested in modern trends and developments in Biology and Experimental Medicine.

ISBN 978-966-2214-30-7

© Authors and Palladin Institute
of Biochemistry, NAS of Ukraine, 2013

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О. В. ПАЛЛАДИНА

БІОХІМІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ - СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ

Головний редактор
академік НАН і НАМН України
С. В. Комісаренко

Київ - 2013

УДК 577+60-22-61

Біохімія і біотехнологія – сучасній медицині

Голов. ред. С. В. Комісаренко. – К.:

ФОП Москаленко О. М., 2013, 704 с.

Монографія певною мірою є унікальною. Це – зібрання статей, присвячених найактуальнішим проблемам сучасних медико-біологічних наук, як фундаментальних, так і таких, що безпосередньо стосуються медичних наук, зокрема онкології, імунології, ендокринології, діагностики та лікування інфекційних захворювань. Автори статей – переважно світові лідери з певних напрямів біології – біохімії, молекулярної та клітинної біології, біотехнології, а також суміжних наук. Серед авторів є і найвідоміші вчені світу, і молоді талановиті науковці, але всіх головних авторів статей об'єднує те, що вони є колегами, друзями або співробітниками академіка НАН України С. В. Комісаренка, 70-річному ювілею якого вони присвятили свої статті.

Книгу орієнтовано на широке коло читачів – фахівців, які працюють в експериментальних і прикладних напрямках медико-біологічних наук.

ISBN 978-966-2214-30-7

© Автори та Інститут біохімії
ім. О. В. Палладіна НАН України, 2013

PREFACE

Leonid KRAVCHUK

First President of Ukraine and Head, Ukrainian Peace Council



The book, which you are reading, is the collection of scientific articles written by colleagues, friends and/or pupils of academicians of the National Academy of Sciences of Ukraine Serhiy Komisarenko and dedicated to his 70th Anniversary.

In my turn I wish also to congratulate him with such a glorious date and add several words, which are not linked directly to science, but to his state, diplomatic and social society activities.

1990 and 1991 were, perhaps, the most important years in the modern history of Ukraine. In March 1990 the Verkhovna Rada (our Parliament) of Ukraine was elected for the first time in a demo-

cratic way, and on July 9 Verkhovna Rada proclaimed the State Sovereignty of Ukraine.

In July 1990 I was elected as Chairman of the Ukrainian Verkhovna Rada and Vitaliy Massol – as Chairman of the Ukrainian Council of Ministers (our Government). V. Massol started immediately formation of the Government by suggesting to Verkhovna Rada candidates to become his Deputies and Ministers. At that time members of the Government were elected by Verkhovna Rada, and there were cases when there was quite a serious struggle what candidates to elect between the “communist majority” and “democratic minority” as they were called those days. Serhiy Komisarenko was elected Deputy Chairman of the Council of Ministers responsible for humanitarian matters almost unanimously, and it was then when we met for the first time.

A real intellectual came to the Ukrainian Government – member of the Academy, intelligent, a person who was deeply understanding humanitarian processes. His responsibilities were vast – education and science, medicine and social matters, culture and religion, youth and sports, radio, TV, press etc. That was ideology – one of the most complicated spheres of human activity.

Years 1990–1992, when Serhiy Komisarenko was working as Deputy Chairman of the Council of Ministers and later Deputy Prime Minister in the Government chaired by Vitold Fokin were very complicated. It was a historic period of Ukraine's transition to become independent state and shortly after the proclamation of Ukraine's independence, when the new state, just being born, had to establish all state institutions, make own legislation, in humanitarian area in particular. And Serhiy Komisarenko was taking active part in drafting laws, concerning freedom of worship and media, on social security and education, on science and healthcare, on AIDS in particular. Special attention he paid to the development of science, education and medicine, which were close to his profession and interests.

For me, being the first person in the state, the most important was that he initiated and was dealing not only with ordinary and every day matters but with strategic ones, which were advancing country's image. As, for example, commemorating 50 anniversary of the tragedy in Babiy Yar or conducting the World Congress of Ukrainians. He has analytical and large-scale vision. This is a personality, which has made so much for Ukraine and definitely will do more.

When Ukraine started its real diplomatic service I offered to Serhiy Vasiliovych to become the first Ambassador of Ukraine in the United Kingdom, and almost six years he was representing Ukraine with dignity and honour in one of the most important for us countries. I remember with pleasure one of the first visits abroad of the President of Ukraine. It was February 1993. Reception by the Queen in the Buckingham Palace, negotiations with British Prime Minister, ceremonial dinner hosted by the Lord Mayor of London in the Guildhall, meeting with "British Ukrainians", visiting Edinburgh – everything was organized in the best way possible with the participation of the Ukrainian Embassy under the leadership of the Ambassador. We were meeting in Britain also later, when I was coming there with lectures or seminars, dedicated to Ukraine. Ukrainian Ambassador always assisted my visits and took active part in meetings, as, for example, in Birmingham University.

In 1997 I was elected Chairman of the Ukrainian Peace Council. I consider my lasting peace activity, heading the Ukrainian Peace Council, as an important and honorable public duty. My predecessors at this duty

were prominent Ukrainian personalities as academician Mykola Semenko, academician Vassil Komisarenko (Serhiy's father) and writer Oles Honchar. I guess that it was quite natural that I have suggested to Serhiy Komisarenko to be the first Deputy Chairman of the Ukrainian Peace Council after his return from London having in mind his experience as a statesman, diplomat and scientist. And it is already 15 years that he is my trustworthy and dignified assistant in peace keeping activity in Ukraine.

70 years for scientist – member of the National Academy of Sciences, for public figure – it is like reaching the top of the life's mountain, when the person becomes full of wisdom and experience and when he is capable to make so much for his country and for his people. The main thing – is to keep going. There is an oriental saying, that at the end of the road nobody waits for a person who already left off the road. So, whatever are the difficulties or obstacles, it is necessary to keep going the way, which one has selected for his life.

I wish Serhiy Komisarenko many happy returns of the day and many years of fruitful activity in his life.

Книга, яку Ви читаєте, є збіркою наукових статей колег, друзів та учнів академіка НАН України С. В. Комісаренка, написаних на його честь та до його 70-річного ювілею. Я, в свою чергу, теж хочу привітати його з важливим ювілеєм та додати декілька слів на його шану, що прямо не стосуються науки, але пов'язані з державною, дипломатичною та громадською діяльністю ювіляра.

1990 і 1991 роки були чи не найважливішими в сучасній історії України. У березні 1990 року було вперше демократично обрано Верховну Раду УРСР, а 9 липня Верховна Рада оголосила про Державний суверенітет України.

У липні 1990 року мене було обрано Головою Верховної Ради УРСР, а В. А. Масола – Головою Ради Міністрів УРСР. Віталій Андрійович відразу почав формувати склад Уряду – пропонувати Верховній Раді своїх заступників та міністрів. Тоді членів Уряду обирала Верховна Рада, і навколо деяких кандидатур часто точилася серйозна боротьба між, як тоді їх називали, «компартійною більшістю» та «демократичною меншістю». Сергій Васильович був обраний майже одностайно заступником Голови Ради Міністрів УРСР з гуманітарних питань і став, здається, єдиною заміною серед заступників В. А. Масола. Тоді ми і познайомилися.

До Уряду України прийшов справжній інтелектуал – академік, людина, яка, природно, глибоко розуміється на гуманітарних про-

цесах. До його повноважень потрапили освіта і наука, медицина і соціальні питання, культура і релігія, молодь і спорт, радіо, телебачення і преса тощо. А це – ідеологія, одна з найскладніших сфер людської діяльності.

1990–1992 роки, коли Сергій Комісаренко працював спочатку заступником Голови Ради Міністрів УРСР, а потім – заступником Прем'єр-міністра України в Уряді під керівництвом В. П. Фокіна, були дуже складними. Це був період переходу до незалежності України і відразу після її оголошення, коли молодій державі, яка щойно народилася, треба було розбудовувати всі державні інституції, створювати свої власні закони, зокрема в гуманітарній сфері. І Сергій Васильович брав активну участь у розробленні законів, що стосувалися свободи совісті, свободи преси і засобів масової інформації, пенсійного забезпечення і освіти, науки і медицини, зокрема першого Закону про боротьбу зі СНІДом. Особливу увагу він, зрозуміло, приділяв проблемам науки, медицини і освіти, що були йому близькі за фахом і освітою.

Для мене, як першої особи в Державі, було важливим те, що він брався не тільки за якісь практичні справи, але й вирішував питання, які були резонансними для України та підвищували її імідж. Як, наприклад, відзначення 50 років трагедії в Бабиному Яру або проведення Всесвітнього конгресу українців. Характер у нього – аналітичний, масштабний. Тобто, це людина, яка зробила чимало для України і обов'язково ще багато зробить.

Коли в Україні почали розбудовувати справжню дипломатичну службу, я запропонував Сергієві Васильовичу стати Послом України в Британії, і він з честю майже шість років представляв Україну в одній з найважливіших для нас країн. Я з великою приємністю згадую один із перших візитів Президента України за кордон. Це було в лютому 1993 року. Прийняття в Королеви в Букінгемському палаці, переговори з Прем'єр-міністром Великої Британії, урочистості у лорда-мера Лондона, зустріч з «британськими» українцями, відвідання Единбурга – все було організовано професійно за участю Посольства України під керівництвом Посла С. В. Комісаренка. Ми зустрічалися в Британії і пізніше, коли я приїжджав туди з лекціями або для участі в семінарах, присвячених Україні. Сергій Васильович завжди сприяв моїм візитам і брав активну участь у зустрічах, зокрема, у Бірмінгемському університеті.

У 1997 році мене обрали головою Української Ради Миру (УРМ). Я вважаю свою миротворчу діяльність на чолі Української Ради Миру вкрай важливим і почесним громадським обов'язком. Моїми попередниками на цій посаді (у радянські часи УРМ мала назву

Український комітет захисту миру) були такі знакові для України постаті, як академік АН УРСР М. П. Семененко, академік АН УРСР та НАМН України В. П. Комісаренко (батько Сергія Васильовича) і письменник-академік О. Т. Гончар. Думаю, цілком природно, що, маючи на увазі державний, дипломатичний і науковий досвід академіка і Посла України С. В. Комісаренка, я запропонував йому після повернення з Лондона до України посаду першого заступника голови Української Ради Миру. З того часу, вже п'ятнадцять років, він є моїм надійним та достойним помічником у миротворчій діяльності.

Сімдесят років для вченого – академіка, для громадського діяча, це, можна сказати, середина широкої життєвої дороги, коли людина набирається мудрості, досвіду і коли вона так багато може зробити для суспільства, для своєї країни. Головне, не зійти з дороги! Оскільки є така східна мудрість, що на того, хто зійшов з дороги, не треба чекати в її кінці. Слід, попри все, йти дорогою, яку обрав.

Тож я бажаю Сергієві Васильовичу ще багатьох і плідних років на широкому життєвому шляху! Многії Вам літа!

*Перший Президент України,
Голова Української Ради Миру*

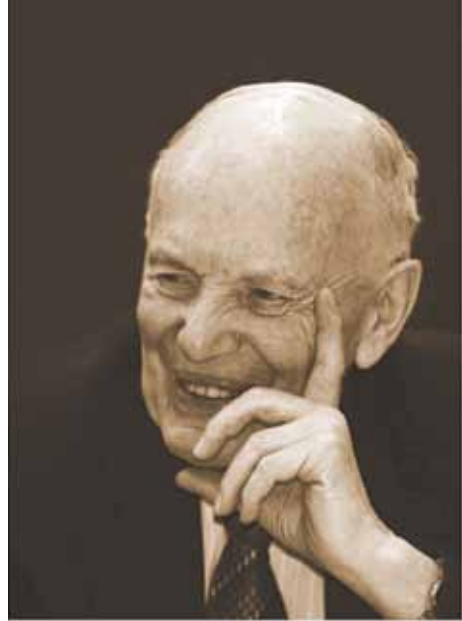


Л. М. Кравчук

Boris PATON

*President of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Academician of NAS of Ukraine*

The book, which is proposed to the readers, was written by a big group of world known foreign and Ukrainian scientists – biologists and physicians, representing science in 11 countries. The articles of the book are dedicated to the urgent problems of modern biochemistry and biotechnology, their indisputable influence on medical sciences and on applied medicine. The book is published on the eve of the scientific conference «Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine» on the above mentioned important biomedical problems.



The initiator and active organizer of this conference and of this book is Professor Serhiy Vasiliovych Komisarenko – a prominent Ukrainian scientist – biochemist and immunologist, Member of the National Academy of Sciences and of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Academician-Secretary of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology of our Academy, who celebrates this year his 70th Anniversary on July 9.

Professor Komisarenko is directing successfully Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine from the beginning of 1989 with a break for a diplomatic work in 1992-1998. He founded and developed fruitfully a new scientific trend for our country – molecular immunology. His profound investigations and knowledge made also crucial impact in studying the exceptionally negative effects of low radiation on human immunity after the Chornobyl Nuclear Power Plant accident.

It should be noted that the themes of the published book articles and of the Conference coincide essentially with the trends of the research and with scientific interests of Serhiy Komisarenko. Besides fundamental science, Professor Komisarenko gives great attention to Biosafety problems, in

particular – to the decrease of biological threats in Ukraine, heading the Commission on Biosafety and Biosecurity at the National Security and Defence Council of Ukraine.

In due time Academician Komisarenko combined efficiently his scientific work with official statesman activities being Deputy Head of the Council of Ministers of Ukraine, Vice Prime Minister of Ukraine and the first Ukrainian Ambassador to the United Kingdom. Owing to his efforts the British Antarctic station «Faraday» was transferred to Ukraine. The station has become a centre of polar research in our country now and bears the name of V. I. Vernadsky, our famous compatriot, a world-wide known scientist.

I hope that this edition, prepared with the direct participation of Professor S. V. Komisarenko, will be of interest for many scientists and specialists engaged in biological sciences and medicine.

Книга, що пропонується читачам, написана великим колективом всесвітньовідомих зарубіжних і вітчизняних учених – біологів і медиків з 11 країн. Статті книги присвячені актуальним питанням сучасної біохімії та біотехнології, їх безумовному впливу на медичні науки та практичну медицину. Вона виходить друком до наукової конференції «Біохімія і біотехнологія – сучасній медицині» і стосується саме цих важливих проблем.

Ініціатором і активним організатором конференції і видання цієї монографії є Сергій Васильович Комісаренко – видатний український вчений-біохімік і імунолог, академік Національної академії наук і Національної академії медичних наук України, академік-секретар Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології нашої академії, якому 9 липня поточного року виповнилося 70 років.

Академік С. В. Комісаренко успішно очолює Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України з початку 1989 року з перервою на дипломатичну роботу у 1992–1998 роках. Він започаткував і плідно розвинув для нашої країни новий науковий напрям – молекулярну імунологію. Його глибокі дослідження і ґрунтовні знання відіграли важливу роль у вивченні надзвичайно негативного впливу не тільки значних, але й малих доз радіації на імунітет людини після аварії на Чорнобильській атомній станції.

Слід зазначити, що тематика статей опублікованої книги і наукової конференції істотно збігається з науковими інтересами і напрямками досліджень академіка Комісаренка. Поза науковою робо-

тою, присвяченою фундаментальним дослідженням, перебуваючи на посаді голови Комісії з біобезпеки і біозахисту при Раді національної безпеки і оборони України, він також багато уваги приділяє проблемам біобезпеки, зокрема зменшенню біозагроз в Україні.

Свого часу академік С. В. Комісаренко вміло поєднував наукову роботу з відповідальною державною діяльністю на високих посадах заступника Голови Ради Міністрів України, віце-прем'єр-міністра України та першого посла України в Сполученому Королівстві Великої Британії та Північної Ірландії. Завдяки його зусиллям Британську антарктичну станцію «Фарадей» було передано Україні. Зараз ця станція стала центром полярних досліджень в Україні і носить ім'я нашого славетного співвітчизника, вченого зі світовим ім'ям – В. І. Вернадського.

Сподіваюсь, що це видання, підготовлене за безпосередньою участю академіка С. В. Комісаренка, буде корисним широкому колу вчених і фахівців, які цікавляться розвитком біологічних і медичних наук.

*Президент Національної
академії наук України,
академік НАН України*



Б. Є. Патон

Serhiy V. KOMISARENKO.
A WORD FROM THE EDITOR-IN-CHIEF



Dear friends and colleagues, those who read these lines, Please trust me that I am writing them with special feelings. 70th Anniversary years is a wonderful opportunity to stop, at least for a moment, in the middle of every day “whatever activities” and to recall in the memory the most important and most pleasant events that happened during the life. And meetings with colleagues belonging to the scientific community are indeed among the most enjoyable of these memories.

But I will start by expressing my deepest gratitude to two of my direct leaders. For two years (1990-1992) I was working in the Ukrainian Government under the leadership of Leonid Kravchuk, first President of Ukraine. He also appointed me as the first Ukrainian Ambassador to the Court of Saint James’s. It was unique, I am sure, and positive life experience, donated by Fortune, and I am very grateful to Leonid Makarovitch for that.

Under the leadership of academician Boris Paton, President of the National Academy of Sciences of Ukraine, who is a unique personality without any exaggeration, I have the honour to work either 47 years (if counting all my work in the Academy) or over 24 years (from my election as Director of Palladin Institute of Biochemistry). Whatever the count is – all my “scientific” life was in the National Academy of Sciences. And here I have either to stop or to write rather long essay on these 47 years.

This year we had a set of meetings where we met many friends. In particular, it was during FEBS Congress-2013 in St.-Petersburg, at Parnas Conference in Jerusalem, in October 2013 and, certainly, during our “Jubilee” Conference “Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine” in Kyiv, on September 19-20. While organizing the Kyiv Conference, the Organizing Committee has collected articles from possible lecturers (participants of the Conference) and decided to publish them in a book under the Conference’s title. Because the articles published in the book might not be widely available for the scientific community, it was also decided to divide these articles in two sets and to publish them in Palladin Institute’s

two scientific periodicals – «Ukrainian Biochemical Journal» and “Biotechnologia Acta” depending on the content. And here is the result – you hold the book.

I know personally well almost all authors (or principal coauthors if there are several per article). With some of them we are friends for over 40 years, with others - for not so long, but in any case we all are united by the wonderful feeling of a friendly scientific community, by respect to each other and by our common cause, to which we have devoted our lives – to Biomedical sciences, though among contributors one may find biologists, chemists and medical doctors. So I take this opportunity to express my most sincere thanks to my friends-scientists from abroad (who work in 11 countries!), to my Ukrainian colleagues and to the coworkers from our Institute of Biochemistry who were very kind to find time and to write articles in my honour. Without everybody’s good will neither the Conference, nor the book, nor the journals’ issues could not happen.

Most of the articles in this book written by my colleagues are devoted to the scientific themes, on which I was either working myself with my coworkers or which were in the sphere of my scientific interests. There is only one exception in this context. It is the article written by the Nobel laureate professor Aaron Ciechanover. But I am very grateful to Aaron for the possibility to publish his article, which is based on his Nobel Prize lecture, because it is directly linked to the themes of our Conference “Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine”, and the latter gave name to this book. I am also very grateful to Aaron for his good wishes, which he had sent to my jubilee. Besides, in all his lectures, which I have listened to (there were 5 or 6), professor Ciechanover was showing always a slide as an example of a mistake experiment from the article by J.Monod and M.Cohn with a conclusion on metabolic stability of *E. coli* proteins. My memory immediately signaled that Jaques Monod was director of Pasteur Institute in Paris when I was working there in 1974-75, and Melvin Cohn invited me to his lab to work on signaling in lymphocytes when I visited him in the Salk Institute in 1981.

Very nice to note that among authors where the majority is very famous scientists, most of whom are members of academies of sciences of various countries, there are also very young but talented scientists. I am confident that pretty soon they become well known to the world scientific community, and I may only wish them (and myself as well) to follow my good friend – former President of the Weizmann Institute, professor Michael Sela as an example of devotedness to Science and active scientific longevity. He is participant in FEBS Congress-2013, in our Conferen-

ce «Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine» in Kyiv on September 19-20, in Parnas Conference in Jerusalem, and his article is published in the book and in «Biotechnologia Acta» N4, 2013.

And the last but not at all the least. My special and deepest gratitude to the team from Palladin Institute of Biochemistry: Dr. Valentina Danilova, head of the team, Ms. Tetyana Petrenko as well as Dr. Maya Grigorieva, Dr. Asya Demyanenko and Ms. Olga Kiper who did all the job for this book to become a reality. Thanks to all of you!

Шановні друзі і колеги, хто читає ці рядки!
Повірте, я пишу їх з особливими почуттями. Сімдесят років – це чудова нагода зупинитись, хоч не надовго, у вирі «всіляких повсякденних діяльностей» та переглянути в пам'яті найважливіші та найприємніші події, що трапилися у твоєму житті. І зустрічі з колегами по науковому товариству є чи не найприємнішими серед цих спогадів.

Але я почну із подяки двом моїм безпосереднім керівникам. Під керівництвом Леоніда Макаровича Кравчука – Першого Президента України – я працював два роки (1990–1992) в Уряді України. Він же призначав мене і Послом до Сполученого Королівства. То був унікальний і, я переконаний, позитивний життєвий досвід, який мені подарувала Доля, за що я вдячний Леонідові Макаровичу. Під керівництвом академіка Бориса Євгеновича Патона – Президента Національної академії наук України і, без перебільшення, унікальної особистості – я маю честь працювати майже 47 років (якщо рахувати термін роботи в нашій Академії) чи понад 24 роки (з часу обрання мене директором Інституту біохімії). Яким би не був розрахунок – усе моє «наукове» життя проходило в Національній академії наук України.

Цього року було декілька нагод зустрітися з багатьма друзями-вченими. Зокрема, це було у липні у Санкт-Петербурзі під час Конгресу FEBS-2013, на Парнасівській конференції в Єрусалимі в жовтні і, звичайно, на нашій «ювілейній» Конференції «Біохімія і біотехнологія – сучасній медицині» 19–20 вересня у Києві. Під час організації Конференції у Києві, організаційний комітет Конференції зібрав статті можливих лекторів (її учасників) і вирішив опублікувати їх у книзі під назвою цієї конференції. З огляду на те, що статті, видані у книзі в Україні, можуть бути мало доступними для наукового загалу, було також вирішено розділити їх за змістом на дві частини та видати у двох наукових часописах Інституту біохімії

ім. О. В. Палладіна – в «Українському біохімічному журналі» та в «Biotechnologia Acta». А ось і результат – в руках Ви тримаєте книгу.

Я особисто добре знайомий з усіма авторами або головними співавторами, якщо їх декілька у статті. З деякими з них я товаришую понад 40 років, із деякими – не так довго, але всіх нас об'єднує чудове почуття дружньої колегіальності, повага один до одного і те, що ми присвятили своє життя спільній справі – медико-біологічним наукам, хоча в авторському колективі є і біологи, і хіміки, і медики. Тож я користуюсь нагодою, щоб висловити щиро подяку – моїм друзям-вченим з-за кордону (які працюють в 11 країнах світу!), моїм українським колегам та співробітникам нашого Інституту, які були настільки ласкавими, щоб знайти час і можливість написати статті на мою честь, за що я їм щиро вдячний. Без доброї волі кожного з них цієї книги не було б.

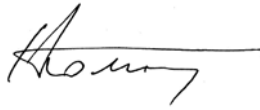
Переважає більшість статей моїх колег присвячена науковим темам, якими я чи безпосередньо займався зі своїми співробітниками протягом наукової діяльності, чи які були в колі моїх наукових інтересів. Можливо, єдиним винятком у цьому контексті є стаття лауреата Нобелівської премії професора Аарона Чіхановера. Але я дуже вдячний Аарону за надану можливість опублікувати статтю за матеріалами його Нобелівської лекції, тому що вона безпосередньо пов'язана з темами нашої конференції «Біохімія і біотехнологія – сучасній медицині», а назва конференції стала назвою нашої книги. Я також дякую йому за добрі побажання до мого ювілею. Окрім того, у кожній із своїх лекцій, які я чув (а їх було 5 чи 6), професор Чіхановер показував як приклад помилкового експерименту слайд зі статтею Ж. Моно та М. Кона з їхнім висновком про метаболічну стабільність протеїнів, синтезованих *E. coli*. Пам'ять відразу підказує, що Жак Моно був директором Інституту Пастера, коли я там працював у 1974–75 роках, а в лабораторії Мелвіна Кона в Інституті Солка я був у 1981 році. Він тоді запрошував мене працювати в його лабораторії над вивченням сигналіngu в лімфоцитах.

Дуже приємно відзначити, що серед авторів, де переважають відомі вчені, більшість з яких є членами академій наук різних країн, є зовсім молоді, але талановиті, які, я переконаний, невдовзі стануть відомими науковому світові. І тут я їм (а також і собі) можу тільки побажати брати приклад з мого давнього друга – колишнього Президента Вайцманівського Інституту, професора Майкла Села, який є зразком відданості Науці та активного наукового довголіття. Цього року він є учасником у Конгресі FEBS-2013, і в нашій конференції у Києві, і в Парнасівській конференції в Єрусалимі, а його стаття надрукована і в цій книзі, і в часописі «Biotechnologia Acta» (N4, 2013).

Нарешті останнє, але вкрай важливе. Моя особлива і щира подяка «команді» Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України – лідеру «команди» к.б.н. В. М. Даниловій, а також Т. М. Петренко, к.б.н. М. В. Григор'євій, к.б.н. А. П. Дем'яненко та О. М. Кіпер, які доклали величезних зусиль аби ця книга стала реальністю.

Дякую їм усім!

*Директор Інституту
біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України,
академік НАН і НАМН
України*



С. В. Комісаренко

«A MAN OF FOUR» - Mr. KOMISARENKO IN MY EYES

HUANMING YANG, Ph.D.

Beijing Genomic Institute, China

*It is difficult for a man to be both a good professor and a good diplomat,
It is very difficult for a man to be both a good researcher and a good politician,
It is very very difficult to be a man of all the four, a good professor and a good
researcher, a good politician and a good diplomat.*

Even if it is very rare, I have found such one, a man of the four, the only man I have ever met in my life until now in this world, Serhiy Komisarenko, in Ukraine.

I have just met Serhiy a few times, in Beijing and in Seville, in my institute and at an international meeting. I quickly recognized him comprehensive and could not but admit his great. I was not only impressed by his professional knowledge and visions, but also by his professional manner or style, a style of a general professor or a researcher.

It is well known that he has been one of the most versatile researchers in the field of immunochemistry at the international level, and has contributed to the field extensively. Also, it is all known to us that he is prolific researcher and has multiple research directions, mainly in immunochemical analysis of proteins and peptides, in molecular mechanisms of lymphocyte activation and in interrelation between protein immunochemical structure and their biological function. His contribution to biosafety is widely acknowledged that, under his guidance, it was found for the first time that low doses of radiation depressing the natural immunity in human, when Chornobyl Nuclear Plant exploded in 1986. His books, his hundreds of scientific papers in international journals and hundreds of lectures at international meetings, as well as his numerous awards including the most prestigious one for non-Chinese by the Chinese Central Government, have enhanced his global reputation in the international scientific community as somebody like me (even far worse), so called a researcher, or a scientist.

It is also all known that he has been teaching for decades in Kyiv State University and many other universities, on many subjects in the wide fields of life science and biotechnology. His students, of bachelor, master, and Ph. D.s, now «at every corner under the heaven» in Ukraine and many other countries, would all acknowledge that he has shaped, at least

helped shape, their life and careers as somebody like me, a professor or a «teacher» as it is called in Chinese.

It is usual for a researcher and/or a scientist to hold some administrative positions, like Serhiy's numerous titles as secretary, head, or director of a department, institute, or a university. It is also not that unusual for some of them to be at high leveler, as a secretary of an academy who is responsible for many divisions or Institutes, like some of my friends. However, it was a really nice surprise to me when I was told that he is one of the most important statesmen in Ukraine. He is the former Deputy Chairman of Council of Ministers, Deputy Prime Minister responsible for humanitarian sector including health care, culture, education, science, social security, etc. almost everything I know and am interested in. He was even elected as a candidate to the post of the President of Ukraine. I can promise now that I had had voted for him if I had been a voter.

It is the general impression of scientists to the public that they are always thinking, or pretending to be thinking, in other words, not so social. It is known that not every politician is a qualified diplomat. Again, Serhiy is both. I was more surprised that he is a professional diplomat, the former Ambassador of Ukraine to several important countries such as UK and Ireland.

If you are also one of his friends, after listening to his stories about his deeply loved nation, after reading his articles on Ukrainian culture and politics, you would understand why he is the right person to be born in the right country and live in the right time in its history, and has chosen the right professions to have made the right contribution to his great nation, as well as to the whole world, and why only he can be such «a man of four».

It is indeed a privilege to be a friend and a colleague of Mr. Komisarenko, a real «man of four».

«ОТ ДЕТСКОЙ РОГАТКИ ДО СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ» (отрывки из воспоминаний о С. В. Комисаренко)

Профессор К. П. ЗАК – руководитель лаборатории
гормональной регуляции кроветворения
Института эндокринологии и обмена веществ
им. В. П. Комисаренко НАМН Украины

Очень быстро течёт время, которое нам отпущено генами и Всевышним. Летят года, а с возрастом молниеносно проносятся и десятилетия. Хорошо помню то время, когда я в возрасте чуть более двадцати лет был аспирантом академика В. П. Комисаренко в его лаборатории эндокринологии в Институте экспериментальной биологии и патологии им. А. А. Богомольца.

В «богомольцевском» саду возле института, где стоял дом и где жили ближайшие сотрудники и ученики Александра Александровича Богомольца, я неоднократно встречал мальчика 5–6 лет, бегущего с рогаткой. Это был младший сын моего шефа – Серёжа Комисаренко, в будущем – видный ученый, академик, вице-премьер-министр Украины и первый Посол Украины в Великобритании. А откуда рогатка? Василий Павлович привез из Германии много лабораторного оборудования, и среди микроскопов и других точных приборов были замечательные резиновые трубки, и он как-то смущенно попросил меня: «Константин Петрович, не могли бы Вы или Зоя Леонидовна (З. Л. Черногорова – мать Виталия Коротича – работала помощницей В. П., как мы все называли Василия Павловича) отрезать для моего младшего сына сантиметров 20 резиновой трубки? Ему крайне необходимо для рогатки, так как у них скоро будут соревнования на меткость».

Когда мне стало известно, что этому «мальчику» исполняется 70 лет, я сначала не поверил и задумался. Неужели я знаком с Сергеем Васильевичем уже более 60 лет? В конце 1951 года семья Комисаренко переехала с улицы Богомольца в «дом медиков» на улице Горького, и первые годы мы с супругой иногда встречали Сергея – школьника на улице Пушкинской (где жили мы) или на улице Ленина, рядом со школой, где он учился. Позднее – видели молодого, красивого юношу-студента медицинского института. При случае Василий Павлович всегда с гордостью рассказывал про успехи своих сыновей, особенно младшего, который отлично учился и в школе, и в институте, и уже в школе свободно владел английским языком. Естественно, более тесное и осмысленное знакомство с Сергеем Васильевичем состоялось значительно позже, когда он стал научным

сотрудником Института биохимии им. А. В. Палладина. Причиной нашего близкого знакомства и, думаю, дружбы (несмотря на разницу в возрасте) стало уже теперь многолетнее научное сотрудничество. Оказалось, что для решения важнейших научных проблем, которые возникли в моей научной деятельности, необходимы были знания и умения Сергея Васильевича. Несмотря на разницу в нашей научной специализации (я – морфолог-гематолог, а он биохимик-иммунолог), а может быть именно из-за этой разницы, наше сотрудничество, по моему мнению, оказалось весьма плодотворным, и я хочу остановиться на этом подробнее, так как у меня есть основания считать, что этот фрагмент научной деятельности академика Сергея Комисаренко менее всего известен.

Оказалось, что без личного участия Сергея Васильевича и сотрудников его лаборатории трудно было бы ответить на такие кардинальные вопросы как морфология стволовых клеток, действие ионизирующего облучения на организм человека, возникшего в результате аварии на ЧАЭС, и участие иммунной системы в патогенезе сахарного диабета.

История начала изучения стволовых клеток в Украине такова. Однажды будущий академик АН УССР Зоя Андреевна Бутенко, просматривая в библиотеке последние номера зарубежных гематологических журналов (это было приблизительно в мае 1969 года), наткнулась на статью, в которой упоминалось о неизвестной ей «stem cell», являющейся, по утверждению авторов, родоначальником всех клеток кроветворной и иммунной систем. Авторами этой работы были J. E. Till и E. A. McCulloch. Недолго думая, она послала им стандартную открытку института с просьбой выслать ей их публикации. Прошло месяца два, и она получила репринты. С этого и стала «верёвочка виться».

Как известно, J. E. Till и E. A. McCulloch первыми в 1961 году разработали метод определения числа полипотентных кроветворных клеток на основании их способности образовывать колонии в селезёнке. Они доказали, что одна стволовая клетка при её трансплантации смертельно облучённому животному образует в его селезёнке одну колонию. Такие клетки, обладающие способностью образовывать весь спектр более зрелых кровяных и иммунных клеток, стали обозначать как колониеобразующие единицы селезёнки (КОЕс).

Лишь впоследствии (T. R. Bradly, D. Metcalf, 1966; M. A. Moore, D. Metcalf, 1974) был разработан метод определения стволовых клеток в агаровых культурах, позволяющий выявлять коммитированные в определённом направлении развития кроветворные клетки, так называемые колониеобразующие единицы культур (КОЕк). Причём

этот метод стал применим для изучения гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) не только у животных, но, что очень важно, и у человека. Кстати, уместно также отметить, что в последующем состоялась и личная встреча З. А. Бутенко и меня с одним из соавторов этого метода — М. А. Моогe — в Пицунде на IX Конгрессе по сравнительной лейкологии в 1979 году. М. Мур оказался очень любезным, относительно молодым, высоким, стройным и красивым мужчиной с яркими голубыми глазами. Мы общались с ним по несколько раз в день в течение недели, гуляли по берегу моря, купались и, конечно, говорили о стволовых клетках.

В течение буквально года в лаборатории З. А. Бутенко был хорошо налажен метод J. E. Till и E. A. McCulloch по определению КОЕс, который и сейчас остаётся в мире одним из основных классических методов по определению количества колониеобразующих клеток. В Институте проблем онкологии АН УССР, которым тогда руководил один из ближайших друзей и коллег В. П. Комисаренко — академик АН УССР Р. Е. Кавецкий, были начаты серьёзные исследования по выяснению роли колониеобразующих клеток при лейкозе.

Однако всех интересовал вопрос, как же всё-таки морфологически выглядит стволовая кроветворная клетка? В то время существовало мнение, что родоначальной кроветворной клеткой является гемоцитобласт. На светооптическом уровне в мазках костного мозга и периферической крови морфологию гемоцитобласта различные гематологи описывали неодинаково, а некоторые авторы даже отрицали его существование. Первоначальные исследования клеточных суспензий, обогащённых КОЕс, в световом микроскопе также дали противоречивые результаты.

Этот период времени совпал с бурным развитием ультраструктурной цитологии различных видов клеток и тканей, что было обусловлено недавним появлением электронных микроскопов высокого разрешения для биологических целей. Благодаря настойчивым усилиям и авторитету академика Василия Павловича Комисаренко (в то время уже директора созданного им Института эндокринологии и обмена веществ МЗ УССР) один из первых в СССР таких микроскопов высокого разрешения (JEM-7) фирмы Jeol (Япония) был «выделен» для нашего Института, а основную работу на микроскопе проводила наша лаборатория гормональной регуляции кроветворения. В этой же лаборатории с помощью французских учёных — директора института патологии клетки в Париже проф. M. Bessis и его ближайшего сотрудника, зав. отделом ультраструктурной цитологии, милейшей и доброжелательной проф. G. Breton-Gorius впервые в Украине был освоен метод электронной микроскопии клеток крови и

кровенворных органов с заключением их в эпоксидные смолы (эпон и аралдит). Так как светооптические исследования по выяснению морфологии кроветворной стволовой клетки были дискуссионны, то стал вопрос: нельзя ли разрешить эту проблему с помощью электронной микроскопии? Однако для этого необходимо было располагать препаратами высокообогащённых КОЕс. Поэтому мы занялись получением обогащенной клеточной фракции костного мозга (КМ) мышей, обладающей высокой КОЕс. Для этого был разработан метод введения мышам-донорам оксимочевины и кортизона, которые приводили к резкому увеличению (более чем в 30 раз) КОЕс. Для ещё большего обогащения концентратов КОЕс и освобождения суспензий от ряда клеточных элементов, не обладающих колониеобразующей способностью, проводилось дифференциальное центрифугирование в градиенте плотности альбумина и перкола. Сейчас эти методы выглядят достаточно тривиальными и простыми, а тогда нам пришлось затратить много усилий пока все «заработало».

При электронно-микроскопическом исследовании таких обогащённых КОЕс концентратов было обнаружено, что в них преобладают лимфоцитоподобные мононуклеары диаметром 8–10 мкм с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, с округлым эухроматичным ядром с нежным рисунком хроматина и одним-двумя контурируемыми ядрышками. Узкая полоска цитоплазмы этих клеток была бедна органеллами. Мы наблюдали только несколько малых округлых митохондрий, почти полное отсутствие шероховатого эндоплазматического ретикулума, зоны Гольджи, гранул и лизосом, но они имели большое число свободных рибосом. Обнаруженные клетки были осторожно нами названы «кандидатами в гемопоэтические стволовые клетки» (ГСК). Данные об ультраструктуре КОЕс были опубликованы в 1974 г. в очень престижном тогда журнале «Доклады Академии наук СССР» (Кавецкий Р. Е. и др., 1974). Это была первая печатная работа в бывшем Советском Союзе по морфологии ГСК.

В последующем для ещё большего уточнения морфологии КОЕс и устранения примеси Т-лимфоцитов в исследуемых образцах их обрабатывали высокоспецифичной антисывороткой к Т-лимфоцитам, что вызывало деструкцию более 80% тимоцитов. Ввиду некоторого сходства молодых лимфоцитоподобных клеток с незрелыми эритробластами дополнительно использовали метод ультрацитохимического выявления эндогенной пероксидазы, а для устранения прилипающих клеток моноцитарно-макрофагального ряда препараты инкубировали в CO_2 – инкубаторе в пластиковых чашках или с частичками латекса.

Морфологически идентифицируемые нами клетки в обогащенных фракциях КМ, обладающие очень высокой колониеобразующей способностью и названные «кандидатами в ГСК», были очень близки к ГСК мышей и приматов, описанным всемирно признанными авторитетами: директором института радиобиологии Нидерландов, профессором А. W. van Bekkum и его ближайшим сотрудником — электронномикроскопистом К. E. Dike (van Bekkum A. W. et al., 1971; Dike K. E. et al., 1973). Для нас было важным, что последний при личной встрече высоко оценивал наши исследования, однако у нас не было стопроцентной уверенности в том, что все описанные нами клетки принадлежат к полипотентным ГСК. Это частично было обусловлено еще и тем, что на препаратах для электронной микроскопии не все клетки срезались экваториально, и не всегда можно было в них определить все цитоплазматические органеллы. Следовательно для более точной цитологической идентификации ГСК требовалось располагать дополнительным и надёжным маркером.

В 1975 году из зарубежной научной командировки возвратился С. В. Комисаренко, который в 1974–1975 годах работал в Институте Пастера в Париже в лаборатории проф. S. Avrameas. Стратис Аврамеас был известным иммуноцитохимиком, который в 1966 году вместе с Жозе Уриэлем впервые в мире предложил использовать фермент пероксидазу из хрена в иммунохимическом анализе. Интересно отметить, что и Аврамеас, и Уриэль были учениками выдающегося иммунохимика и первого директора Института по исследованию рака в Вильжуифе (Франция), профессора Пьера Грабара, который был никем иным, как родившемся в Киеве Петром Николаевичем Грабаром, впоследствии академиком Академии медицины Франции и ученым, который изобрел иммуноэлектрофорез. Возможно, также интересно отметить, что Василий Павлович Комисаренко был первым советским ученым, посетившим Петра Николаевича Грабара в его лаборатории в Институте Пастера в Париже в 1946 году!

Однако вернемся к идентификации ГСК. Еще до командировки во Францию Сергей Васильевич пытался применить пероксидазу для маркирования антител, но без особого успеха. Начав работать в лаборатории Аврамеаса, С. Комисаренко сразу выяснил, что пероксидаза, которой он пользовался в СССР, была непригодна для иммунохимии. Это были препараты венгерской фирмы «Реанал» с объявленной активностью $RZ = 0,6$ (на самом деле RZ было около $0,3-0,4$, где было много инактивированного фермента), в то время, когда для иммунохимических (и прежде всего для иммуноцитохимических) исследований надо было применять высокоочищенную пероксидазу с $RZ = 3,0-3,2$. Во Франции такую высокоактивную пероксидазу

получали в сухом льду из фирмы Сигма, однако в СССР её не было. Поэтому, после возвращения в Киев, Сергей Васильевич наладил хроматографическую очистку малоактивной «реаналовской пероксидазы» и стал получать препараты с $RZ = 3,2$. Такая пероксидаза была идеальна как для ферментативного маркирования антител, так и для исследования клеток, которые синтезировали антитела против пероксидазы. Более того, в лаборатории иммунохимии, которая была создана для С. Комисаренко после его возвращения из Франции, он освоил в то время самый современный метод получения и применения амплифицирующего комплекса РАР (ПАП: пероксидаза–антитела против пероксидазы), который позволял в разы усилить иммуногистохимическое выявление искомым антигенов (или маркеров). Им была также получена антистволовоклеточная сыворотка, которая с помощью ПАП-метода была использована для маркировки КОЕс, содержащихся в обогащенных ГСК фракциях КМ (Комиссаренко С. В. и др., 1986). Причём маркировка ГСК проводилась лично Сергеем Васильевичем, и все этапы этого тонкого метода были выполнены его руками.

Электронно-микроскопические исследования препаратов, полученных с использованием ПАП-комплекса, полностью подтвердили полученные нами ранее данные о том, что предполагаемые КОЕс являются в большинстве своём характерными лимфоцитоподобными мононуклеарами с эухроматичным ядром и узким ободком цитоплазмы, бедной органеллами. Вместе с тем, среди маркированных мононуклеаров встречались и лимфоцитоподобные клетки с мозаичным рисунком хроматина. Полученные данные были напечатаны в ряде престижных журналов, в том числе и в публикациях Европейского общества гематологов – известном журнале «Blut» (Butenko Z. A. et al., 1983). Эти работы получили мировое признание и многократно цитируются. Интересно, что высокоочищенные С. Комисаренко препараты пероксидазы были также с большим успехом использованы доктором биологических наук В. А. Майским в лаборатории академика АН УССР Ф. Н. Серкова для исследования ретроградного транспорта в структуры головного мозга.

Естественно, в то время, т.е. более 30 лет тому назад, мы не располагали точными иммунологическими маркерами для определения полипотентных ГСК и их многих субклассов по кластерам дифференцировки (CD). Не было, конечно, ни методов цитофлуориметрической сортировки клеток, экспрессирующих различные мембранные антигены, ни выделения клеток с помощью магнитных шариков, покрытых моноклональными антителами (MACS), ни других методов выделения отдельных популяций клеток. В то же

время полученные нами тогда данные давали первую информацию о том, как морфологически выглядят клетки общей популяции ГСК (КОЕс), которые образуют колонии у смертельно облучённых животных, т.е. самых молодых клеток, дающих начало всем кроветворным и иммунокомпетентным клеткам организма. Можно заметить, что недавно сотрудниками фирмы Mitenus Biotec, разработавших метод сортировки клеток с помощью магнитных шариков, покрытых моноклональными антителами (mini MACS), было показано, что в высокоочищенных концентратах клеток CD34+, выделенных из костного мозга человека, содержатся преимущественно лимфоцитоподобные клетки, по своей структуре подобные описанным нами (ранее в 1974–1983 гг.).

С. В. Комисаренко принимал активное участие в организации и проведении первых двух Всесоюзных симпозиумов по стволовой клетке, организованных Академией наук СССР в Киеве в 1977 и 1983 годах, в частности способствовал приглашению некоторых выдающихся зарубежных учёных, как, например, Роберта Галло, Николаса Эйвриона Митчисона и др., с которыми был хорошо знаком. Проведение этих симпозиумов АН СССР в Киеве было признанием достижения украинских учёных в исследовании ГСК. В симпозиумах принимали участие видные учёные из США, Великобритании, ФРГ, Франции, Венгрии, Чехословакии, Польши и, конечно, СССР. С программным докладом на первом симпозиуме «Достижения и трудности в морфологической идентификации стволовых кроветворных клеток» выступила академик АН УССР З. А. Бутенко.

К одному из наиболее значимых результатов научного сотрудничества отдела молекулярной иммунологии Института биохимии, руководимого Сергеем Васильевичем, с лабораторией гормональной регуляции кроветворения Института эндокринологии и обмена веществ, который сейчас носит имя его основателя – В. П. Комисаренко, следует отнести также изучение действия малых доз радиации на организм человека в связи с аварией на Чернобыльской АЭС – трагедией нашей страны. В первые же дни после аварии С. В. Комисаренко, который в то время руководил республиканской межведомственной научной программой «Механизмы иммуностимуляции», предпринял энергичные усилия для создания временной научной группы по изучению влияния допустимых доз облучения, специфического для ЧАЭС спектра радионуклидов на иммунный статус человека. Не получив поддержку со стороны МЗ УССР, он обратился за ней к начальнику Центрального военно-медицинского управления Советской армии, генерал-полковнику медицинской службы академику АМН СССР Ф. И. Комарову с предложением изучить иммун-

ный статус у военнослужащих, мобилизованных для работ на ЧАЭС. Ф. И. Комаров поддержал инициативу и дал поручение начальнику научного отдела ЦВМУ полковнику С. И. Черняку организовать сопровождение предлагаемого проекта. В такую «сборную» научную группу под руководством С. В. Комисаренко вошли такие сотрудники: от Института биохимии им. А. В. Палладина АН УССР – Д. И. Лукинов, Н. П. Карлова, Г. Н. Фомовская, С. Э. Миленко, от Института эндокринологии и обмена веществ МЗ УССР – К. П. Зак, В. В. Афанасьева, М. А. Грузов и Б. М. Хоменко, от НИИ отоларингологии им. А. С. Коломийченко МЗ УССР – О. Ф. Мельников и М. Б. Самбур, от Института проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого АН УССР – Н. М. Бережная, от Ленинградского института военной медицины – полковник медслужбы В. И. Легеза.

Объектом наблюдения стала группа молодых (практически одного возраста) мужчин из разных областей бывшего Союза, принимавших участие в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС и получивших допустимую дозу облучения – 0,25 Гр, что контролировалось всеми методами радиометрии. Особую ценность представлял тот факт, что исследования проводили на одних и тех же лицах до их направления в зону аварии, во время работы в «зоне» и после набора дозы, равной 0,25 Гр. После возвращения ликвидаторов аварии на место постоянного жительства их обследование повторялось через месяц и через год после набора дозы. Было проведено детальное обследование иммунологических и гематологических параметров, которые сравнивались у одного и того же лица из данной группы ликвидаторов, что позволяло четко проследить динамику изменения этих параметров у каждого из них, нивелируя индивидуальные различия в группе. Планировалось повторить исследование этих же лиц через пять лет после работы на ЧАЭС, но продолжение работы не состоялось из-за распада СССР.

Несомненным основополагающим фактором для проведения исследований стало то, что за несколько лет до аварии в отделе молекулярной иммунологии, руководимым С.В. Комисаренко, был приобретён и освоен первый в Украине (и, по-видимому, первый по-настоящему функционирующий в СССР) уникальный в то время прибор – лазерный проточный цитофлуориметр EPICS-C фирмы Coulter с опцией для сортировки клеток. В отделе молекулярной иммунологии цитофлуориметр применяли для изучения лимфоцитов мыши, но как только случилась авария на ЧАЭС Сергей Васильевич связался с коллегами во Франции, и ему прислали наборы моноклональных антител к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека, что дало возможность количественно определять субпопу-

ляционный состав лимфоцитов у ликвидаторов, а также выделять нужные субпопуляции клеток на сортировщике для их последующего ультраструктурного анализа на микроскопе JEM-100 фирмы JEOL в нашей лаборатории гормональной регуляции гемопоэза.

В результате проведенных исследований уже к концу 1986 года, а особенно в 1987 году, когда были обработаны данные о всех участниках эксперимента, а также данные повторных исследований у этих же участников, полученные позже (через месяц или даже через год после «выхода из зоны облучения»), стало очевидным, что малые дозы радиации (0,25 Гр) практически не приводили к достоверным изменениям со стороны общего числа лейкоцитов и лейкоцитарной формулы, а также со стороны «классических» показателей иммунитета (как, например, уровней разных классов иммуноглобулинов в сыворотке крови). В то же время было обнаружено снижение активности, а также уменьшение относительного и абсолютного числа CD56+ больших гранулоцитарных лимфоцитов (БГЛ), которые считались морфологическим гомологом естественных клеток-киллеров (НК-клеток).

Ультраструктурный анализ оставшихся в крови БГЛ обнаружил значительные нарушения их субмикроскопической организации. Спустя год после облучения у большинства, но не у всех из исследованных лиц, произошло восстановление числа БГЛ в крови, хотя у многих из них (даже у тех, у кого число БГЛ восстановилось) оставались существенные нарушения субмикроскопической структуры БГЛ. Интересно отметить, что у некоторых ликвидаторов с особенно сниженным количеством НК-клеток, которые продолжали обследоваться в Украине, через несколько лет были выявлены злокачественные новообразования. У всех ликвидаторов при электронно-микроскопическом исследовании отмечались также отчетливые изменения ультраструктуры CD4+ Т-лимфоцитов сразу после облучения. В этой статье я детально не останавливаюсь на данных, полученных в результате проведенных исследований. Большинство из них изложены в монографии «Радиация и иммунитет человека» (Киев, 1994) под редакцией С. В. Комисаренко и К. П. Зака. Насколько нам известно, это были первые в мире данные, полученные в то время на самом современном методическом уровне о влиянии малых доз радиации на систему естественного иммунитета у людей, которая отвечает прежде всего за противовирусный и противоопухолевый иммунитет. Эти данные можно в полной мере назвать уникальными, но они находились в противоречии с существовавшей в СССР концепцией о безопасности малых доз радиации для здоровья человека и поэтому были встречены «в штыки» особенно «печально известным» в Украине генералом Л. Ильиным из Института биофизики МЗ СССР, в

котором, как оказалось, иммунологические исследования находились на самом низком уровне.

Главным аргументом наших оппонентов против полученных данных было утверждение о том, что найденные изменения связаны не с влиянием малых доз радиации, а со стрессом, который якобы влиял на здоровье ликвидаторов. Возможно, что стресс внес свой негативный вклад, хотя непонятно, почему этот вклад (если он был) сказывался на системе природного (естественного), а не адаптивного иммунитета. Более того, исследования, проведенные через месяц и через год после работ в «зоне», когда стресс, присущий работе около ЧАЭС, отсутствовал, подтвердили снижение природного иммунитета у лиц, получивших малые дозы облучения. Сергей Васильевич инициировал и дальнейшее исследование найденного нами эффекта, но уже на животных. Он договорился с академиком АМН СССР Б. А. Лапиным — директором Института экспериментальной патологии и терапии АМН СССР — о проведении экспериментов о влиянии малых доз радиации на приматах. Для этого сотрудники его отдела летали в Сухуми, выделяли лимфоциты облученных обезьян, маркировали их антителами и пересылали в Киев. Результаты первой же серии экспериментов подтвердили результаты, полученные ранее у ликвидаторов.

Эти данные о влиянии малых доз радиации на показатели природного иммунитета у людей были запрещены для публикации вплоть до 1990—1991 годов. Возможно, это было потому, что они ставили под сомнение нормы, существовавшие на атомных электростанциях или на военных кораблях с атомными двигателями. И сейчас они не очень известны в Украине во многом из-за того, что проблемой медицинских последствий аварии на ЧАЭС в нашей стране руководят преимущественно те, кто в 1986—1990 годах выступал в русле официальной политики об отсутствии влияния малых доз радиации на здоровье людей. В то же время надо отдать должное академику АМН СССР Ф. И. Комарову, без поддержки которого и, естественно, ЦВМУ Минобороны СССР выполнение этой работы было бы невозможно.

Отдел, руководимый Сергеем Васильевичем, сделал также большой вклад в изучение роли иммунитета в патогенезе сахарного диабета 1- и 2-го типа, являющегося бичом человечества. Как известно, в настоящее время наблюдается резкое увеличение частоты этого заболевания во всём мире, носящее характер пандемии. Как уже указывалось, отдел Сергея Васильевича располагал лазерным проточным цитофлуориметром с сортировочной приставкой, позволявшим с помощью меченых моноклональных антител к соответствующим

щим поверхностным антигенам лимфоцитов не только определять количество определенных субпопуляций лимфоцитов, но и выделять сортировкой высокоочищенные фракции лимфоцитов, что было особенно важно для исследования ультраструктуры этих клеток. При тесном сотрудничестве сотрудников отдела Сергея Васильевича (Д. И. Лукинов, Н. П. Карлова, С. Э. Миленко) и нашей лаборатории (М. А. Грузов) были выполнены первые в СССР и в Украине работы по исследованию иммунофенотипа лимфоцитов у больных сахарным диабетом 1- и 2-го типов, что дало возможность более точно выяснить некоторые кардинальные вопросы о роли иммунитета в патогенезе этого заболевания.

Как известно, пик научной деятельности у учёных медико-биологического профиля значительно длиннее и наступает позднее, чем у физиков и математиков, так как природный талант биологов и врачей пополняется ещё и многолетним жизненным опытом. Следовательно у Сергея Васильевича остаётся ещё большой резерв времени для дальнейших свершений в областях биохимии и молекулярной иммунологии.

В заключение мне бы хотелось отметить для меня самое важное. Приведенные выше отрывки из моих воспоминаний о творческих контактах с академиком С. В. Комисаренко являются только фрагментом моего искренне дружеского отношения к нему, его семье и к его замечательным родителям, от которых он унаследовал лучшие человеческие качества. За многие годы моего знакомства с Сергеем Васильевичем он никогда не изменял главным чертам своего характера — принципиальности, справедливости, смелости, порядочности, а также доступности и доброжелательности к людям независимо от их национальности или социального положения. Приятно, что за эти же годы его неотразимая улыбка почти не изменилась.

**INTRACELLULAR PROTEIN DEGRADATION:
FROM A VAGUE IDEA THRU THE LYSOSOME
AND THE UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM
AND ON TO HUMAN DISEASES
AND DRUG TARGETING**
(Nobel Lecture)

Aaron CIECHANOVER

*The David and Janet Polak Cancer and Vascular Biology Research Center,
The Rappaport Faculty of Medicine and Research Institute,
Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel;
e-mail:c_tzachy@netvision.net.il*

Between the 1950s and 1980s, scientists were focusing mostly on how the genetic code was transcribed to RNA and translated to proteins, but how proteins were degraded had remained a neglected research area. With the discovery of the lysosome by Christian de Duve it was assumed that cellular proteins are degraded within this organelle. Yet, several independent lines of experimental evidence strongly suggested that intracellular proteolysis was largely non-lysosomal, but the mechanisms involved have remained obscure. The discovery of the ubiquitin-proteasome system resolved the enigma. We now recognize that degradation of intracellular proteins is involved in regulation of a broad array of cellular processes, such as cell cycle and division, regulation of transcription factors, and assurance of the cellular quality control. Not surprisingly, aberrations in the system have been implicated in the pathogenesis of human disease, such as malignancies and neurodegenerative disorders, which led subsequently to an increasing effort to develop mechanism-based drugs.

The concept of protein turnover is hardly 70 years old. Beforehand, body proteins were viewed as essentially stable constituents that were subject to only minor ‘wear and tear’: dietary proteins were believed to function primarily as energy-providing fuel, which were independent from the structural and functional proteins of the body. The problem was hard to approach experimentally, as research tools were not available. Important research tools that were lacking at that time were sta-

Abbreviations used: ODC, ornithine decarboxylase; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase; PEPCK, phosphoenol-pyruvate carboxykinase; TAT, tyrosine aminotransferase; APF-1, ATP-dependent Proteolysis Factor 1 (ubiquitin); UBIP, ubiquitous immunopoietic polypeptide (ubiquitin); MCP, multicatalytic proteinase complex (26S proteasome); CP, 20S core particle (of the proteasome); RP, 19S regulatory particle (of the proteasome).

ble isotopes. While radioactive isotopes were developed earlier by George de Hevesy (de Hevesy G., Chemistry 1943. In: *Nobel Lectures in Chemistry 1942-1962*. World Scientific 1999. pp. 5-41), they were mostly unstable and could not be used to follow metabolic pathways). The concept that body structural proteins are static and the dietary proteins are used only as a fuel was challenged by Rudolf Schoenheimer in Columbia University in New York City. Schoenheimer escaped from Germany and joined the Department of Biochemistry in Columbia University founded by Hans T. Clarke (1-3). There he met Harold Urey who was working in the Department of Chemistry and who discovered deuterium, the heavy isotope of hydrogen, a discovery that enabled him to prepare heavy water, D₂O. David Rittenberg who had recently received his Ph.D. in Urey's laboratory, joined Schoenheimer, and together they entertained the idea of '*employing a stable isotope as a label in organic compounds, destined for experiments in intermediary metabolism, which should be biochemically indistinguishable from their natural analog*' (1). Urey later succeeded in enriching nitrogen with ¹⁵N, which provided Schoenheimer and Rittenberg with a 'tag' for amino acids and as a result for the study of protein dynamics. They discovered that following administration of ¹⁵N-labeled tyrosine to rat, only ~50% can be recovered in the urine, '*while most of the remainder is deposited in tissue proteins. An equivalent of protein nitrogen is excreted*' (4). They further discovered that from the half that was incorporated into body proteins '*only a fraction was attached to the original carbon chain, namely to tyrosine, while the bulk was distributed over other nitrogenous groups of the proteins*' (4), mostly as an αNH₂ group in other amino acids. These experiments demonstrated unequivocally that the body structural proteins are in a dynamic state of synthesis and degradation, and that even individual amino acids are in a state of dynamic interconversion. Similar results were obtained using ¹⁵N-labeled leucine (5). This series of findings shattered the paradigm in the field at that time that: (1) ingested proteins are completely metabolized and the products are excreted, and (2) that body structural proteins are stable and static. Schoenheimer was invited to deliver the prestigious Edward K. Dunham lecture at Harvard University where he presented his revolutionary findings. After his untimely tragic death in 1941, his lecture notes were edited Hans Clarke, David Rittenberg and Sarah Ratner, and were published in a small book by Harvard University Press. The editors called the book '*The Dynamic State of Body Constituents*' (6), adopting the title of Schoenheimer's presentation. In the book, the new hypothesis was clearly presented: '*The simile of the combustion engine pictured the steady state flow of fuel into a fixed system, and the conversion of this fuel into waste products. The new results imply that not only the fuel, but the structural materials are in a steady state of flux. The classical picture must thus be replaced by one which*

takes account of the dynamic state of body structure'. However, the idea that proteins are turning over had not been accepted easily, and was challenged as late as the mid-1950s. For example, Hogness and colleagues studied the kinetics of β -galactosidase in *Escherichia coli* and summarized their findings (7): *'To sum up: there seems to be no conclusive evidence that the protein molecules within the cells of mammalian tissues are in a dynamic state. Moreover, our experiments have shown that the proteins of growing E. coli are static. Therefore it seems necessary to conclude that the synthesis and maintenance of proteins within growing cells is not necessarily or inherently associated with a 'dynamic state'*. While the experimental study involved the bacterial β -galactosidase, the conclusions were broader, including also the authors' hypothesis on mammalian proteins. The use of the term *'dynamic state'* was not incidental, as they challenged directly Schoenheimer's studies.

Now, after more than seven decades of research in the field of intracellular proteolysis, and with the discovery of the lysosome and later the ubiquitin-proteasome system, it is clear that the field has been revolutionized. We now recognize that intracellular proteins are turning over extensively, that the process is specific, and that the stability of many proteins is regulated individually and can vary under different conditions. From a scavenger, unregulated and non-specific end process, it has become clear that proteolysis of cellular proteins is a highly complex, temporally controlled and tightly regulated process that plays major roles in a broad array of basic pathways. Among these processes are cell cycle, development, differentiation, regulation of transcription, antigen presentation, signal transduction, receptor-mediated endocytosis, quality control, and modulation of diverse metabolic pathways. Subsequently, it has changed the paradigm that regulation of cellular processes occurs mostly at the transcriptional and translational levels, and has set regulated protein degradation in an equally important position. With the multitude of substrates targeted and processes involved, it has not been surprising to find that aberrations in the pathway have been implicated in the pathogenesis of many diseases, among them certain malignancies, neurodegeneration, and disorders of the immune and inflammatory system. As a result, the system has become a platform for drug targeting, and mechanism-based drugs are currently developed, one of them is already on the market.

The lysosome and intracellular protein degradation

In the mid-1950s, Christian de Duve discovered the lysosome (see, for example, Refs. 8 and 9 and Fig. 1). The lysosome was first recognized biochemically in rat liver as a vacuolar structure that contains various hydrolytic enzymes which function optimally at an acidic pH. It is surrounded by a membrane that endows the contained enzymes latency that is required

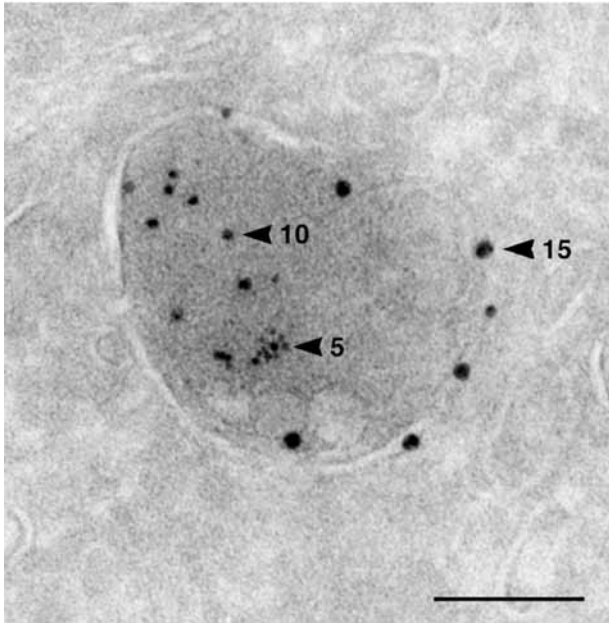


Fig. 1. The lysosome: Ultrathin cryosection of a rat PC12 cell that had been loaded for 1 hour with bovine serum albumin (BSA)-gold (5 nm particles) and immunolabeled for the lysosomal enzyme cathepsin B (10-nm particles) and the lysosomal membrane protein LAMP1 (15 nm particles). Lysosomes are recognized also by their typical dense content and multiple internal membranes. Bar, 100 nm. Courtesy of Viola Oorschot and Judith Klumperman, Department of Cell Biology, University Medical Centre Utrecht, The Netherlands

to protect the cellular contents from their action (see below). The definition of the lysosome was broadened over the years because it had been recognized that the digestive process is dynamic and involves numerous stages of lysosomal maturation together with the digestion of both exogenous proteins (which are targeted to the lysosome through receptor-mediated endocytosis and pinocytosis) and exogenous particles (which are targeted via phagocytosis; the two processes are known as heterophagy), as well as digestion of endogenous proteins and cellular organelles (which are targeted by micro- and macro-autophagy; see Fig. 2). The lysosomal/vacuolar system as we currently recognize it is a discontinuous and heterogeneous digestive system that also includes structures that are devoid of hydrolases – for example, early endosomes which contain endocytosed receptor-ligand complexes and pinocytosed/phagocytosed extracellular contents. On the other extreme it includes the residual bodies - the end products of the completed digestive processes of heterophagy and autophagy. In between

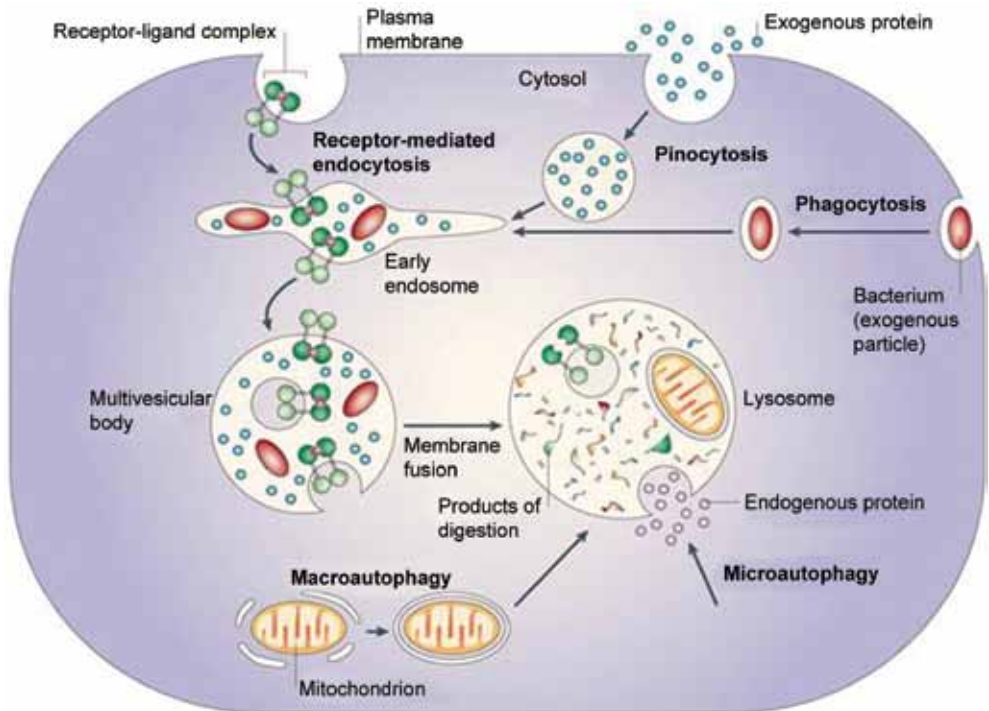


Fig. 2. The four digestive processes mediated by the lysosome: (i) specific receptor-mediated endocytosis, (ii) pinocytosis (non-specific engulfment of cytosolic droplets containing extracellular fluid), (iii) phagocytosis (of extracellular particles), and (iv) autophagy (micro- and macro-; of intracellular proteins and organelles)(with permission from Nature Publishing Group. Published originally in Ref. 83)

these extremes one can observe: primary/nascent lysosomes that have not been engaged yet in any proteolytic process; early autophagic vacuoles that might contain intracellular organelles; intermediate/late endosomes and phagocytic vacuoles (heterophagic vacuoles) that contain extracellular contents/particles; and multivesicular bodies (MVBs) which are the transition vacuoles between endosomes/phagocytic vacuoles and the digestive lysosomes.

The discovery of the lysosome along with independent experiments that were carried out at the same time and that have further strengthened the notion that cellular proteins are indeed in a constant state of synthesis and degradation (see, for example, Ref. 10), led scientists to feel, for the first time, that they have at hand an organelle that can potentially mediate degradation of intracellular proteins. The fact that the proteases were separated from their substrates by a membrane provided an explanation for

controlled degradation, and the only problem left to be explained was how the substrates are translocated into the lysosomal lumen, exposed to the activity of the lysosomal proteases and degraded. An important discovery in this respect was the unraveling of the basic mechanism of action of the lysosome in autophagy (reviewed in Ref. 11). Under basal metabolic conditions, portions of the cytoplasm, which contain the entire cohort of cellular proteins, are segregated within a membrane-bound compartment, and are then fused to a primary nascent lysosome and their contents digested. This process was called microautophagy. Under more extreme conditions, starvation for example, mitochondria, endoplasmic reticulum membranes, glycogen bodies and other cytoplasmic entities, can also be engulfed by a process called macroautophagy (see, for example, Ref. 12; the different modes of action of the lysosome in digesting extra- and intracellular proteins are shown in Fig. 2).

However, over a period of more than two decades, between the mid-1950s and the late 1970s, it has become gradually more and more difficult to explain several aspects of intracellular protein degradation based on the known mechanisms of lysosomal activity: accumulating lines of independent experimental evidence indicated that the degradation of at least certain classes of cellular proteins must be non-lysosomal. Yet, in the absence of any 'alternative', researchers came with different explanations, some more substantiated and others less, to defend the 'lysosomal' hypothesis.

First was the gradual discovery that came from different laboratories, that different proteins vary in their stabilities, and their half-life times can span three orders of magnitude, from a few minutes to many days. Thus, the $t_{1/2}$ of ornithine decarboxylase (ODC) is ~ 10 min, while that of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is 15 hours (for review articles, see, for example, Refs. 13, 14). Also, rates of degradation of many proteins were shown to change with changing physiological conditions, such as availability of nutrients or hormones. It was conceptually difficult to reconcile the findings of distinct and changing half lives of different proteins with the mechanism of action of the lysosome, where the microautophagic vesicle contains the entire cohort of cellular (cytosolic) proteins that are therefore expected to degrade at the same rate. Similarly, changing pathophysiological conditions, such as starvation or re-supplementation of nutrients, were expected to affect the stability of all cellular proteins to the same extent. Clearly, this was not the case.

Another source of concern about the lysosome as the organelle in which intracellular proteins are degraded were the findings that specific and general inhibitors of lysosomal proteases have different effects on different populations of proteins, making it clear that distinct classes of pro-

teins are targeted by different proteolytic machineries. Thus, the degradation of endocytosed/pinocytosed extracellular proteins was significantly inhibited, a partial effect was observed on the degradation of long-lived cellular proteins, and almost no was detected on the degradation of short-lived and abnormal/mutated proteins.

Finally, the thermodynamically paradoxical observation that the degradation of cellular proteins requires metabolic energy, and more importantly, the emerging evidence that the proteolytic machinery uses the energy directly, were in contrast with the known mode of action of lysosomal proteases that under the appropriate acidic conditions, and similar to all known proteases, degrade proteins in an exergonic manner.

The assumption that the degradation of intracellular proteins is mediated by the lysosome was nevertheless logical. Proteolysis results from direct interaction between the target substrates and proteases, and therefore it was clear that active proteases cannot be free in the cytosol which would have resulted in destruction of the cell. Thus, it was recognized that any suggested proteolytic machinery that mediates degradation of intracellular protein degradation must also be equipped with a mechanism that separates - physically or virtually - between the proteases and their substrates, and enables them to associate only when needed. The lysosomal membrane provided this fencing mechanism. Obviously, nobody could have predicted that a new mode of post-translational modification - ubiquitination - could function as a proteolysis signal, and that untagged proteins will remain protected. Thus, while the structure of the lysosome could explain the separation necessary between the proteases and their substrates, and autophagy could explain the mechanism of entry of cytosolic proteins into the lysosomal lumen, major problems have remained unsolved. Important among them were: (i) the varying half lives, (ii) the energy requirement, and (iii) the distinct response of different populations of proteins to lysosomal inhibitors. Thus, according to one model, it was proposed that different proteins have different sensitivities to lysosomal proteases, and their half lives *in vivo* correlate with their sensitivity to the action of lysosomal proteases *in vitro* (15). To explain an extremely long half-life of a protein that was nevertheless sensitive to lysosomal proteases, or alterations in the stability of a single protein under various physiological states, it was suggested that although all cellular proteins are engulfed into the lysosome, only the short-lived proteins are degraded, whereas the long-lived proteins exit back into the cytosol: '*To account for differences in half-life among cell components or of a single component in various physiological states, it was necessary to include in the model the possibility of an exit of native components back to the extralysosomal compartment*' (16). According to a different model, selectivity was determined by the binding affinity of the

different proteins to the lysosomal membrane which controls their entry rates into the lysosome, and subsequently their degradation rates (17). For a selected group of proteins, such as the gluconeogenic enzymes phosphoenol-pyruvate carboxykinase (PEPCK) and fructose-1,6-biphosphatase, it was suggested, though not firmly substantiated, that their degradation in the yeast vacuole was regulated by glucose via a mechanism called 'catabolite inactivation' that possibly involves their phosphorylation. However this regulated mechanism for vacuolar degradation was limited only to a small and specific group of proteins (see for example Ref. 18; reviewed in Ref. 19). More recent studies have shown that at least for stress-induced macroautophagy, a general sequence of amino acids, KFFERQ, directs, via binding to a specific 'receptor' and along with cytosolic and lysosomal chaperones, the regulated entry of many cytosolic proteins into the lysosomal lumen. While further corroboration of this hypothesis is still required, it can only explain the mass entry of a large population of proteins that contain a homologous sequence, but not the targeting for degradation of a specific protein under defined conditions (reviewed in refs. 20, 21). The energy requirement for protein degradation was described as indirect, and necessary, for example, for protein transport across the lysosomal membrane (22) and/or for the activity of the H⁺ pump and the maintenance of the low acidic intralysosomal pH that is necessary for optimal activity of the proteases (23). We now know that both mechanisms require energy. In the absence of any alternative, and with lysosomal degradation as the most logical explanation for targeting all known classes of proteins at the time, Christian de Duve summarized his view on the subject in a review article published in the mid-1960s, saying: *'Just as extracellular digestion is successfully carried out by the concerted action of enzymes with limited individual capacities, so, we believe, is intracellular digestion'* (24). The problem of different sensitivities of distinct protein groups to lysosomal inhibitors has remained unsolved, and may have served as an important trigger in future quest for a non-lysosomal proteolytic system.

Progress in identifying the elusive, non-lysosomal proteolytic system(s) was hampered by the lack of a cell-free preparation that could faithfully replicate the cellular proteolytic events - i.e. degrading proteins in a specific and energy-requiring mode. An important breakthrough was made by Rabinovitz and Fisher who found that rabbit reticulocytes degrade abnormal, amino acid analogue-containing hemoglobin (25). Their experiments modeled known disease states, the hemoglobinopathies. In these diseases abnormal mutated hemoglobin chains (such as sickle cell hemoglobin) or excess of unassembled normal hemoglobin chains (which are synthesized normally, but also excessively in thalassemias, diseases in which the pairing chain is not synthesized at all or is mutated and rapidly degraded,

and consequently the bi-heterodimeric hemoglobin complex is not assembled) are rapidly degraded in the reticulocyte (26, 27). Reticulocytes are terminally differentiating red blood cells that do not contain lysosomes. Therefore, it was postulated that the degradation of hemoglobin in these cells was mediated by a non-lysosomal machinery. Etlinger and Goldberg (28) were the first to isolate and characterize a cell-free proteolytic preparation from reticulocytes. The crude extract selectively degraded abnormal hemoglobin, required ATP hydrolysis, and acted optimally at a neutral pH, which further corroborated the assumption that the proteolytic activity was of a non-lysosomal origin. A similar system was isolated and characterized later by Hershko, Ciechanover, and their colleagues (29). Additional studies by this group led subsequently to resolution, characterization, and purification of the major enzymatic components from this extracts and to the discovery of the ubiquitin signalling system (see below).

The lysosome hypothesis is challenged

As mentioned above, the unraveled mechanism(s) of action of the lysosome could explain only partially and at times not satisfactorily, several key emerging characteristics of intracellular protein degradation. Among them were the heterogeneous stability of individual proteins, the effect of nutrients and hormones on their degradation, and the dependence of intracellular proteolysis on metabolic energy. The differential effect of selective inhibitors on the degradation of different classes of cellular proteins (see above but mostly below), could not be explained at all.

The evolution of methods to monitor protein kinetics in cells together with the development of specific and general lysosomal inhibitors has resulted in the identification of different classes of cellular proteins, long- and short-lived, and the discovery of the differential effects of the inhibitors on these groups (see, for example, Refs. 30,31). An elegant experiment in this respect was carried out by Brian Poole and his colleagues in the Rockefeller University. Poole was studying the effect of lysosomotropic agents, weak bases such as ammonium chloride and chloroquine, which accumulate in the lysosome and dissipate its low acidic pH. It was assumed that this mechanism underlies also the anti-malarial activity of chloroquine and similar drugs where they inhibit the activity of the parasite's lysosome, 'paralyzing' its ability to digest the host's hemoglobin during the intra-erythrocytic stage of its life cycle. Poole and his colleagues metabolically labeled endogenous proteins in living macrophages with ^3H -leucine and 'fed' them with dead macrophages that had been previously labeled with ^{14}C -leucine. They assumed, apparently correctly, that the dead macrophages debris and proteins will be phagocytosed by live macrophages and targeted to the lysosome for degradation. They monitored the effect of

lysosomotropic agents on the degradation of these two protein populations, In particular, they studied the effect of the weak bases chloroquine and ammonium chloride (which enter the lysosome and neutralize the H^+ ions), and the acid ionophore X537A which dissipates the H^+ gradient across the lysosomal membrane. They found that these drugs specifically inhibited the degradation of extracellular proteins, but not that of intracellular proteins (32). Poole summarized these experiments and explicitly predicted the existence of a non-lysosomal proteolytic system that degrades intracellular proteins: *'Some of the macrophages labeled with tritium were permitted to endocytise the dead macrophages labeled with ^{14}C . The cells were then washed and replaced in fresh medium. In this way we were able to measure in the same cells the digestion of macrophage proteins from two sources. The exogenous proteins will be broken down in the lysosomes, while the endogenous proteins will be broken down wherever it is that endogenous proteins are broken down during protein turnover'* (33; the paragraph is copied verbatim; A.C.).

The requirement for metabolic energy for the degradation of both prokaryotic (34) and eukaryotic (10, 35) proteins was difficult to explain. Proteolysis is an exergonic process and the thermodynamically paradoxical energy requirement for intracellular proteolysis made researchers believe that energy cannot be consumed directly by proteases or the proteolytic process per se, and is used indirectly. As Simpson summarized his findings (10): *'The data can also be interpreted by postulating that the release of amino acids from protein is itself directly dependent on energy supply. A somewhat similar hypothesis, based on studies on autolysis in tissue minces, has recently been advanced, but the supporting data are very difficult to interpret. However, the fact that protein hydrolysis as catalyzed by the familiar proteases and peptidases occurs exergonically, together with the consideration that autolysis in excised organs or tissue minces continues for weeks, long after phosphorylation or oxidation ceased, renders improbable the hypothesis of the direct energy dependence of the reactions leading to protein breakdown'*. Being cautious however, and probably unsure about this unequivocal conclusion, Simpson still left a narrow orifice opened for a proteolytic process that requires energy in a direct manner: *'However, the results do not exclude the existence of two (or more) mechanisms of protein breakdown, one hydrolytic, the other energy-requiring'*. Since any proteolytic process must be at one point or another hydrolytic, the statement that makes a distinction between a hydrolytic process, and an energy-requiring, yet non-hydrolytic one, is not clear. Judging the statement from an historical point of view and knowing the mechanism of action of the ubiquitin system, where energy is required also in the pre-hydrolytic step (ubiquitin conjugation), Simpson may have thought of a two step mechanism, but did not give it a clear description. At the end of this clearly understandable, but at the same time difficult and

convoluted deliberation, Simpson left us with a vague explanation linking protein degradation to protein synthesis, a process that was known to require metabolic energy: *'The fact that a supply of energy seems to be necessary for both the incorporation and the release of amino acids from protein might well mean that the two processes are interrelated. Additional data suggestive of such a view are available from other types of experiments. Early investigations on nitrogen balance by Benedict, Folin, Gamble, Smith, and others point to the fact that the rate of protein catabolism varies with the dietary protein level. Since the protein level of the diet would be expected to exert a direct influence on synthesis rather than breakdown, the altered catabolic rate could well be caused by a change in the rate of synthesis'* (10). With the discovery of lysosomes in eukaryotic cells it could be argued that energy was required for the transport of substrates into the lysosome or for maintenance of the low intralysosomal pH for (see above), for example. The observation by Hershko and Tomkins that the activity of tyrosine aminotransferase (TAT) was stabilized following depletion of ATP (36) indicated that energy could be required at an early stage of the proteolytic process, most probably before proteolysis occurs. Yet, it did not provide a clue as for the mechanism involved: energy could be used, for example, for specific modification of TAT, e.g. phosphorylation, that would sensitize it to degradation by the lysosome or by a yet unknown proteolytic mechanism, or for a modification that activates its putative protease. It could also be used for a more general lysosomal mechanism, one that involves transport of TAT into the lysosome, for example. The energy inhibitors inhibited almost completely degradation of the entire population of cell proteins, confirming previous studies (e.g. 10) and suggesting a general role for energy in protein catabolism. Yet, an interesting finding was that energy inhibitors had an effect that was distinct from that of protein synthesis inhibitors which affected only enhanced degradation (induced by steroid hormone depletion), but not basal degradation. This finding ruled out, at least partially, a tight linkage between protein synthesis and degradation. In bacteria, which lack lysosomes, an argument involving energy requirement for lysosomal degradation could not have been proposed, but other indirect effects of ATP hydrolysis could have affected proteolysis in *E. coli*, such as phosphorylation of substrates and/or proteolytic enzymes, or maintenance of the 'energized membrane state'. According to this model, proteins could become susceptible to proteolysis by changing their conformation, for example, following association with the cell membrane that maintains a local, energy-dependent gradient of a certain ion. While such an effect was ruled out (37), and since there was no evidence for a phosphorylation mechanism (although the proteolytic machinery in prokaryotes had not been identified at that time), it seemed that at least in bacteria, energy was required directly for

the proteolytic process. In any event, the requirement for metabolic energy for protein degradation in both prokaryotes and eukaryotes, a process that is exergonic thermodynamically, strongly indicated that in cells proteolysis is highly regulated, and that a similar principle/mechanism has been preserved along evolution of the two kingdoms. Implying from the possible direct requirement for ATP in degradation of proteins in bacteria, it was not too unlikely to assume a similar direct mechanism in the degradation of cellular proteins in eukaryotes. Supporting this notion was the description of the cell-free proteolytic system in reticulocytes (28, 29), a cell that lacks lysosomes, which indicates that energy is probably required directly for the proteolytic process, although here too, the underlying mechanisms had remained enigmatic at the time. Yet, the description of the cell-free system paved the road for detailed dissection of the underlying mechanisms involved.

The ubiquitin-proteasome system

The cell-free proteolytic system from reticulocytes (28, 29) turned out to be an important and rich source for the purification and characterization of the enzymes that are involved in the ubiquitin-proteasome system. Initial fractionation of the crude reticulocyte cell extract on the anion-exchange resin diethylaminoethyl cellulose yielded two fractions which were both required to reconstitute the energy-dependent proteolytic activity that is found in the crude extract: The unadsorbed, flow through material was denoted fraction I, and the high salt eluate of the adsorbed proteins which was denoted fraction II (38) (Table). This was an important observation and a lesson for the future dissection of the system. For one it suggested that the system was not composed of a single 'classical' protease that has evolved evolutionarily to acquire energy dependence [although such energy-dependent proteases, the mammalian 26S proteasome (see below) and the prokaryotic *Lon* gene product have been described later], but that it was made of at least two components. This finding of a two component, energy-dependent protease, left the researchers with no paradigm to follow, and in attempts to explain the finding, they suggested, for example, that the two fractions could represent an inhibited protease and its activator. Second, learning from this reconstitution experiment and the essential dependence between the two active components, we continued to reconstitute activity from resolved fractions whenever we encountered a loss of activity along further purification steps. This biochemical 'complementation' approach resulted in the discovery of additional enzymes of the system, all required to be present in the reaction mixture in order to catalyze the multi-step proteolysis of the target substrate. We chose first to purify the active component from fraction I. It was found to be a small, ~8.5 kDa

Resolution of the ATP-dependent proteolytic activity from crude reticulocyte extract into two essentially required complementing activities (adapted from Ref. 38; with permission from Elsevier/Biochem. Biophys. Res. Commun.)

Fraction	Degradation of [³ H]globin (%)	
	-ATP	+ATP
Lysate	1.5	10
Fraction I	0.0	0.0
Fraction II	1.5	2.7
Fraction I and Fraction II	1.6	10.6

heat stable protein that was designated ATP-dependent Proteolysis Factor 1, APF-1. APF-1 was later identified as ubiquitin (see below; I am using the term APF-1 to the point where it was identified as ubiquitin and then change terminology accordingly). In retrospect, the decision to start the purification efforts with fraction I turned out to be important, as fraction I contained only one single protein - APF-1 - that was necessary to stimulate proteolysis of the model substrate we used at the time, while fraction II turned out to contain many more. Later studies showed that fraction I contains other components necessary for the degradation of other substrates, but these were not necessary for the reconstitution of the system at that time. This enabled us not only to purify APF-1, but also to quickly decipher its mode of action. If we would have started our purification efforts with fraction II, we would have encountered a significantly bumpier road. A critically important finding that paved the way for future developments in the field was that multiple moieties of APF-1 are covalently conjugated to the target substrate when incubated in the presence of fraction II, and the modification requires ATP (39, 40; Fig. 3 and 4). It was also found that the modification is reversible, and APF-1 could be removed from the substrate or its degradation products (40).

The discovery that APF-1 was covalently conjugated to protein substrates and stimulates their proteolysis in the presence of ATP and crude fraction II, led in 1980 to the proposal of a model according to which protein substrate modification by multiple moieties of APF-1 targets it for degradation by a downstream, at that time an yet unidentified, protease that cannot recognize the unmodified substrate; following degradation, reusable APF-1 was released (40). Amino-acid analysis of APF-1, along with its known molecular mass and other general characteristics raised the suspicion that APF-1 was ubiquitin (41), a known protein of previously unknown function. Indeed, Wilkinson and colleagues confirmed

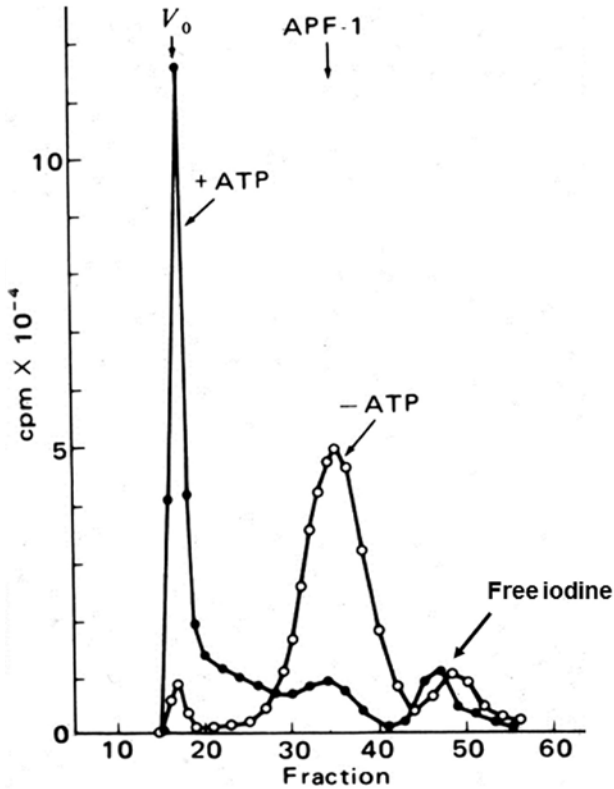


Fig. 3. APF-1/Ubiquitin is shifted to high molecular mass compound(s) following incubation in ATP-containing crude cell extract. ¹²⁵I-labelled APF-1/ ubiquitin was incubated with reticulocyte crude Fraction II in the absence (open circles) or presence (closed circles) of ATP, and the reaction mixtures were resolved via gel filtration chromatography. Shown is the radioactivity measured in each fraction. As can be seen, following addition of ATP, APF-1/ubiquitin becomes covalently attached to some component(s) in fraction II, which could be another enzyme of the system or its substrate(s) (with permission from Proceedings of the National Academy of the USA; published originally in Ref. 39)

unequivocally that APF-1 was indeed ubiquitin (42). Ubiquitin had been first described as a small, heat-stable and highly evolutionarily conserved protein of 76 residues. It was first purified during the isolation of thymopoietin (43) and was subsequently found to be ubiquitously expressed in all kingdoms of living cells, including prokaryotes (44). Interestingly, it was initially found to have lymphocyte-differentiating properties, a characteristic that was attributed to the stimulation of adenylate cyclase (44, 45). Accordingly, it was named UBIP for *ubiquitous immunopoietic polypeptide*

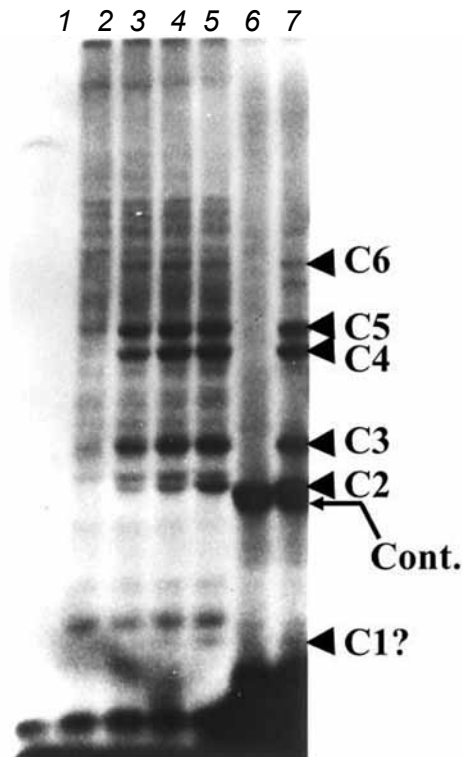


Fig. 4. Multiple molecules of APF-1/Ubiquitin are conjugated to the proteolytic substrate, probably signalling it for degradation. To interpret the data described in the experiment depicted in Figure 2 and to test the hypothesis that APF-1 is conjugated to the target proteolytic substrate, ^{125}I -APF-1/ubiquitin was incubated along with crude Fraction II (Figure 3 and text) in the absence (lane 1) or presence (lanes 2-5) of ATP and in the absence (lanes 1, 2) or presence (lanes 3-5) of increasing concentrations of unlabeled lysozyme. Reaction mixtures resolved in lanes 6 and 7 were incubated in the absence (lane 6) or presence (lane 7) of ATP, and included unlabeled APF-1/ubiquitin and ^{125}I -labeled lysozyme. C1-C6 denote specific APF-1/ubiquitin-lysozyme adducts in which the number of APF-1/ubiquitin moieties bound to the lysozyme moiety of the adduct is increasing, probably from 1 to 6. Reactions mixtures were resolved via sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and visualized following exposure to an X-ray film (autoradiography) (with permission from Proceedings of the National Academy of the USA; published originally in Ref. 40)

(44). However, later studies showed that ubiquitin was not involved in the immune response (46), and that it was a contaminating endotoxin in the preparation that generated the adenylate cyclase and the T-cell differentiating activities. Furthermore, the sequence of several eubacteria and archaeobacteria genomes as well as biochemical analyses in these organisms (unpublished) showed that ubiquitin was restricted only to eukaryotes. The finding of ubiquitin in bacteria (44) was probably due to contamination of the bacterial extract with yeast ubiquitin derived from the yeast extract in which the bacteria were grown. While in retrospect the name ubiquitin is a misnomer, as it is restricted to eukaryotes and is not ubiquitous as was previously thought, it has remained the name of the protein. The reason is probably because it was the name that was first assigned to the protein, and scientists and nomenclature committees tend, in general, to respect this tradition. Accordingly, and in order to avoid confusion, I suggest that the names of other novel enzymes and components of the ubiquitin system, but also of other systems as well, should remain as were first coined by their discoverers.

An important development in the ubiquitin research field was the discovery that a single ubiquitin moiety can be covalently conjugated to histones, particularly to histones H2A and H2B. While the function of these adducts has remained elusive until recently, their structure was unraveled in the mid 1970s. The structure of the ubiquitin conjugate of H2A (uH2A; was also designated protein A24) was deciphered by Goldknopf and Busch (47, 48) and by Hunt and Dayhoff (49) who found that the two proteins are linked through a fork-like, branched isopeptide bond between the carboxy-terminal glycine of ubiquitin (Gly⁷⁶) and the ϵ -NH₂ group of an internal lysine (Lys¹¹⁹) of the histone molecule. The isopeptide bond found in the histone-ubiquitin adduct was suggested to be identical to the bond that was found between ubiquitin and the target proteolytic substrate (50), and between the ubiquitin moieties in the polyubiquitin chain (51,52) that was synthesized on the substrate and that functions as a proteolysis recognition signal for the downstream 26S proteasome. In this particular polyubiquitin chain the linkage is between Gly⁷⁶ of one ubiquitin moiety and internal Lys⁴⁸ of the previously conjugated moiety. Only Lys⁴⁸-based ubiquitin chains are recognized by the 26S proteasome and serve as proteolytic signals. In recent years it has been shown that the first ubiquitin moiety can also be attached in a linear mode to the N-terminal residue of the proteolytic target substrate (53). However, the subsequent ubiquitin moieties are generating Lys⁴⁸-based polyubiquitin chain on the first linearly fused moiety. N-terminal ubiquitination is clearly required for targeting naturally occurring lysine-less proteins for degradation. Yet, several lysine-containing proteins have also been described that traverse this pathway,

the muscle-specific transcription factor MyoD for example. In these proteins the internal lysine residues are probably not accessible to the cognate ligases. Other types of polyubiquitin chains have also been described that are not involved in targeting the conjugated substrates for proteolysis. Thus, a Lys⁶³-based polyubiquitin chain has been described that is probably necessary to activate transcription factors (reviewed recently in Ref. 54). Interestingly, the role of monoubiquitination of histones has also been identified recently, and this modification is also involved in regulation of transcription, probably via modulation of the structure of the nucleosomes (for recent reviews, see, for example, Refs. 55, 56).

The identification of APF-1 as ubiquitin, and the discovery that a high-energy isopeptide bond, similar to the one that links ubiquitin to histone H2A, links it also to the target proteolytic substrate, resolved at that time the enigma of the energy requirement for intracellular proteolysis (see however below) and paved the road to the untangling of the complex mechanism of isopeptide bond formation. This process turned out to be similar to that of peptide bond formation that is catalyzed by tRNA synthetase following amino acid activation during protein synthesis or during the non-ribosomal synthesis of short peptides (57). Using the unraveled mechanism of ubiquitin activation and immobilized ubiquitin as a 'covalent' affinity bait, the three enzymes that are involved in the cascade reaction of ubiquitin conjugation were purified by Ciechanover, Hershko, and their colleagues. These enzymes are: (i) E1, the ubiquitin-activating enzyme, (ii) E2, the ubiquitin-carrier protein, and (iii) E3, the ubiquitin-protein ligase (58, 59). The discovery of an E3 which was a specific substrate-binding component, indicated a possible solution to the problem of the varying stabilities of different proteins – they might be specifically recognized and targeted by different ligases.

In a short period, the ubiquitin tagging hypothesis received substantial support. For example, Chin and colleagues injected into HeLa cells labeled ubiquitin and hemoglobin and denatured the injected hemoglobin by oxidizing it with phenylhydrazine. They found that ubiquitin conjugation to globin was markedly enhanced by denaturation of hemoglobin and the concentration of globin-ubiquitin conjugates was proportional to the rate of hemoglobin degradation (60). Hershko and colleagues observed a similar correlation for abnormal, amino acid analogue-containing short-lived proteins (61). A previously isolated cell cycle arrest mutant that loses the ubiquitin-histone H2A adduct at the permissive temperature (62), was found by Finley, Ciechanover and Varshavsky to harbor a thermolabile E1 (63). Following heat inactivation, the cells fail to degrade normal short-lived proteins (64). Although the cells did not provide direct evidence

for substrate ubiquitination as a destruction signal, they still provided the strongest direct linkage between ubiquitin conjugation and degradation.

At this point, the only missing link was the identification of the downstream protease that would specifically recognize ubiquitinated substrates. Tanaka and colleagues identified a second ATP-requiring step in the reticulocyte proteolytic system, which occurred after ubiquitin conjugation (65), and Hershko and colleagues demonstrated that the energy was required for conjugate degradation (66). An important advance in the field was a discovery by Hough and colleagues, who partially purified and characterized a high-molecular mass alkaline protease that degraded ubiquitin adducts of lysozyme but not untagged lysozyme, in an ATP-dependent mode (67). This protease which was later called the 26S proteasome (see below), provided all the necessary criteria for being the specific proteolytic arm of the ubiquitin system. This finding was confirmed, and the protease was further characterized by Waxman and colleagues who found that it was an unusually large, ~1.5MDa enzyme, unlike any other known protease (68). A further advance in the field was the discovery (69) that a smaller neutral multi-subunit 20S protease complex that was discovered together with the larger 26S complex, was similar to a “multicatalytic proteinase complex” (MCP) that had been described earlier in bovine pituitary gland by Wilk and Orlowski (70). This 20S protease was ATP-independent and has different catalytic activities, cleaving on the carboxy-terminal side of hydrophobic, basic and acidic residues. Hough and colleagues raised the possibility - although they did not show it experimentally - that this 20S protease could be a part of the larger 26S protease that degrades the ubiquitin adducts (69). Later studies showed that indeed, the 20S complex is the core catalytic particle of the larger 26S complex (71, 72). However, a strong evidence that the active ‘mushroom’-shaped 26S protease was generated through the assembly of two distinct sub-complexes - the catalytic 20S cylinder-like MCP and an additional 19S ball-shaped sub-complex (that was predicted to have a regulatory role) - was provided only in the early 1990s by Hoffman and colleagues (73) who mixed the two purified particles and generated the active 26S enzyme.

The proteasome is a large, 26S, multicatalytic protease that degrades polyubiquitinated proteins to small peptides. It is composed of two sub-complexes: a 20S core particle (CP) that carries the catalytic activity, and a regulatory 19S regulatory particle (RP). The 20S CP is a barrel-shaped structure composed of four stacked rings, two identical outer α rings and two identical inner β rings. The eukaryotic α and β rings are composed each of seven distinct subunits, giving the 20S complex the general structure of $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. The catalytic sites are localized to some of the β subunits. Each extremity of the 20S barrel can be capped by a 19S RP each

composed of seventeen distinct subunits, nine in a “base” sub-complex, and eight in a “lid” sub-complex. One important function of the 19S RP is to recognize ubiquitinated proteins and other potential substrates of the proteasome. Several ubiquitin-binding subunits of the 19S RP have been identified, although their biological roles and mode of action have not been discerned. A second function of the 19S RP is to open an orifice in the α ring that will allow entry of the substrate into the proteolytic chamber. Also, since a folded protein would not be able to fit through the narrow proteasomal channel, it was assumed that the 19S particle unfolds substrates and inserts them into the 20S CP. Both the channel opening function and the unfolding of the substrate require metabolic energy, and indeed, the 19S RP “base” contains six different ATPase subunits. Following degradation of the substrate, short peptides derived from the substrate are released, as well as reusable ubiquitin (for a scheme describing the ubiquitin system, see Fig. 5; for the structure of the 26S proteasome, see Fig. 6).

Concluding remarks

The evolution of proteolysis as a centrally important regulatory mechanism has served as a remarkable example for the evolution of a novel biological concept and the accompanying battles to change paradigms. The five decades journey between the early 1940s and early 1990s began with fierce discussions on whether cellular proteins are static as has been thought for a long time, or are turning over. The discovery of the dynamic state of proteins was followed by the discovery of the lysosome that was believed - between the mid-1950s and mid-1970s - to be the organelle within which intracellular proteins are destroyed. Independent lines of experimental evidence gradually eroded the lysosomal hypothesis and resulted in a new idea that the regulated degradation of intracellular proteins under basal metabolic conditions via a non-lysosomal machinery. This resulted in the discovery of the ubiquitin system in the late 1970s and early 1980s. Interestingly, modifications of different target substrates by ubiquitin and ubiquitin-like proteins are now known to be involved in all aspects of lysosomal degradation, such as in the generation of the autophagic vacuoles, and in the routing of cargo-carrying vesicles to the lysosome (see below). Modifications by ubiquitin and ubiquitin-like proteins are now viewed, much like phosphorylation, as a mechanism to generate recognition elements *in trans* on target proteins to which downstream effectors bind. In one case, generation of Lys⁴⁸-based polyubiquitin chains, the binding effector is the 26S proteasome that degrades the ubiquitin-tagged protein. In many other cases, different modifications serve numerous proteolytic (lysosomal) and non-proteolytic functions, such as routing of proteins to their subcellular destinations. We were fortunate at the beginning of our

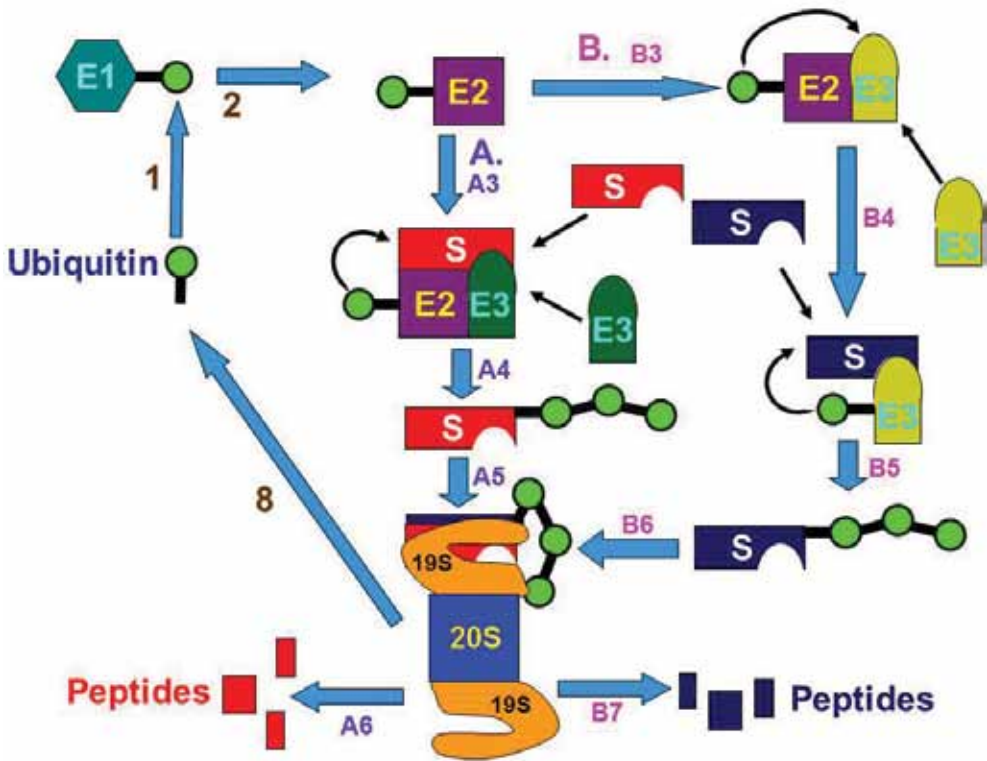


Fig. 5. The ubiquitin-proteasome proteolytic system. Ubiquitin is activated by the ubiquitin-activating enzyme, E1 (1) followed by its transfer to a ubiquitin-carrier protein (ubiquitin-conjugating enzyme, UBC), E2 (2). E2 transfers the activated ubiquitin moieties to the protein substrate that is bound specifically to a unique ubiquitin ligase E3 (A and B). In the case of RING finger ligases, the transfer is direct (A3). Successive conjugation of ubiquitin moieties to one another generates a polyubiquitin chain (A4) that serves as the binding (A5) signal for the downstream 26S proteasome that degrades the target substrates to peptides (A6). In the case of HECT domain ligases, ubiquitin generates an additional thiol-ester intermediate on the ligase (B3), and only then is transferred to the substrate (B4). Successive conjugation of ubiquitin moieties to one another generates a polyubiquitin chain (B5) that binds to the 26S proteasome (B6) followed by degradation of the substrate to peptides (B7). Free and reusable ubiquitin is released by de-ubiquitinating enzymes (DUBs)(8)

studies to have in mind a clear distinction between lysosomal and non-lysosomal proteolytic systems not knowing what we know nowadays that the two processes are linked to one another and are mediated via similar modifications. Had we known that, our route would have been much more complicated.

With the identification of the reactions and enzymes that are involved in the ubiquitin-proteasome cascade, a new era in the protein degradation field began at the late 1980s and early 1990s. Studies that showed that the system was involved in targeting of key regulatory proteins - such as light-regulated proteins in plants, transcriptional factors, cell cycle regulators and tumor suppressors and promoters - started to emerge (see for example Refs. 74-78). They were followed by numerous studies on the underlying mechanisms involved in the degradation of specific proteins, each with its own unique mode of recognition and regulation. The unraveling of the human genome revealed the existence of hundreds of distinct E3s, attesting to the complexity and the high specificity and selectivity of the system. Two important advances in the field were the discovery of the non-proteolytic functions of ubiquitin such as activation of transcription and routing of proteins to the vacuole, and the discovery of modification by ubiquitin-like proteins (UBLs), that are also involved in numerous non-proteolytic functions such as directing proteins to their sub-cellular destination, protecting proteins from ubiquitination, or controlling entire processes such as autophagy (see for example Ref. 79) (for the different roles of modifications by ubiquitin and UBLs, see Fig. 7). All these studies have led to the emerging realization that this novel mode of covalent conjugation plays a key role in regulating a broad array of cellular process - among them cell cycle and division, growth and differentiation, activation and silencing of transcription, apoptosis, the immune and inflammatory response, signal transduction, receptor mediated endocytosis, various metabolic pathways, and the cell quality control - through proteolytic and non-proteolytic mechanisms. The discovery that ubiquitin modification plays a role in routing proteins to the lysosome/vacuole and that modification by specific and unique ubiquitin-like proteins and modification system controls autophagy closed an exciting historical cycle, since it demonstrated that the two apparently distinct systems communicate with one another. With the many processes and substrates targeted by the ubiquitin pathway, it has not been surprising to find that aberrations in the system underlie, directly or indirectly, the pathogenesis of many diseases. While inactivation of a major enzyme such as E1 was obviously lethal, mutations in enzymes or in recognition motifs in substrates that do not affect vital pathways or that affect the involved process only partially, may result in a broad array of phenotypes. Likewise, acquired changes in the activity of the system

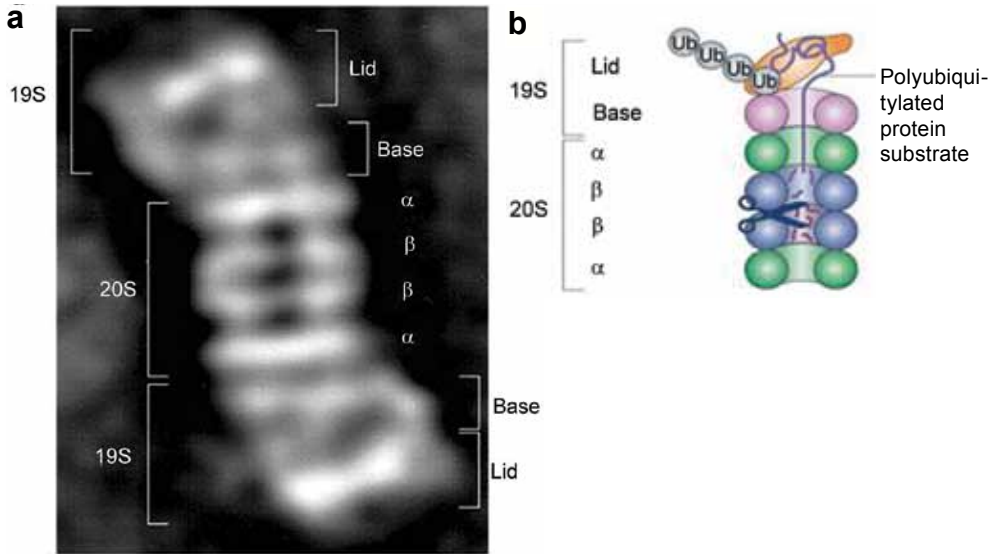


Fig. 6. The Proteasome. The proteasome is a large, 26S, multicatalytic protease that degrades polyubiquitinated proteins to small peptides. It is composed of two sub-complexes: a 20S core particle (CP) that carries the catalytic activity, and a regulatory 19S regulatory particle (RP). The 20S CP is a barrel-shaped structure composed of four stacked rings, two identical outer α rings and two identical inner β rings. The eukaryotic α and β rings are composed each of seven distinct subunits, giving the 20S complex the general structure of $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. The catalytic sites are localized to some of the β subunits. Each extremity of the 20S barrel can be capped by a 19S RP each composed of 17 distinct subunits, 9 in a “base” sub-complex, and 8 in a “lid” sub-complex. One important function of the 19S RP is to recognize ubiquitinated proteins and other potential substrates of the proteasome. Several ubiquitin-binding subunits of the 19S RP have been identified, however, their biological roles mode of action have not been discerned. A second function of the 19S RP is to open an orifice in the α ring that will allow entry of the substrate into the proteolytic chamber. Also, since a folded protein would not be able to fit through the narrow proteasomal channel, it is assumed that the 19S particle unfolds substrates and inserts them into the 20S CP. Both the channel opening function and the unfolding of the substrate require metabolic energy, and indeed, the 19S RP “base” contains six different ATPase subunits. Following degradation of the substrate, short peptides derived from the substrate are released, as well as reusable ubiquitin (with permission from Nature Publishing Group. Published originally in Ref. 83). **a.** Electron microscopy image of the 26S proteasome from the yeast *S. cerevisiae*. **b.** Schematic representation of the structure and function of the 26SA proteasome

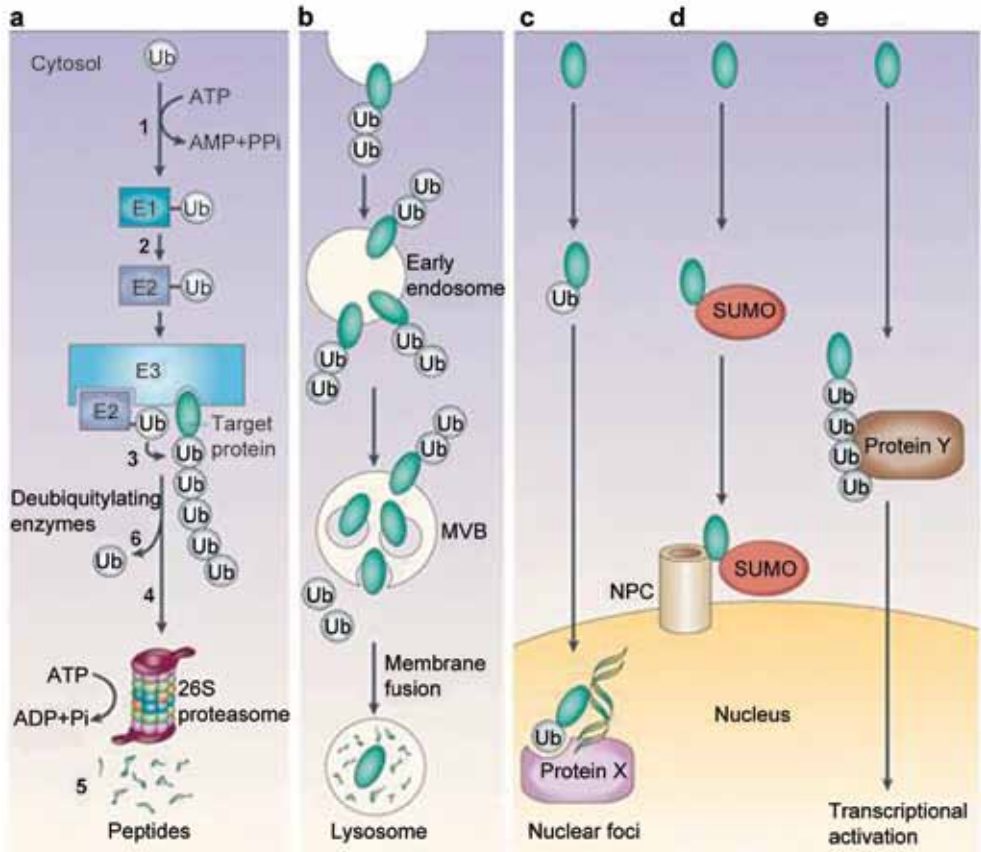


Fig. 7. Some of the different functions of modification by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. A. Proteasomal-dependent degradation of cellular proteins (see Fig. 4). B. Mono or oligoubiquitination targets membrane proteins to degradation in the lysosome/vacuole. C. Monoubiquitination, or D. a single modification by a ubiquitin-like (UBL) protein, SUMO for example, can target proteins to different subcellular destinations such as nuclear foci or the nuclear pore complex (NPC). Modification by UBLs can serve other, non-proteolytic, functions, such as protecting proteins from ubiquitination or activation of E3 complexes. E. Generation of a Lys63-based polyubiquitin chain can activate transcriptional regulators, directly or indirectly [via recruitment of other proteins (Protein Y; shown), or activation of upstream components such as kinases]. Ub denotes ubiquitin, K denotes Lys, and S denotes Cys. (with permission from Nature Publishing Group. Published originally in Ref. 83)

can also evolve into certain pathologies. The pathological states associated with the ubiquitin system can be classified into two groups: **(a)** those that result from loss of function - mutation in a ubiquitin system enzyme or in the recognition motif in the target substrate that result in stabilization of certain proteins, and **(b)** those that result from gain of function - abnormal or accelerated degradation of the protein target (for aberrations in the ubiquitin system that result in disease states, see Fig. 8). Studies that employ targeted inactivation of genes coding for specific ubiquitin system enzymes and substrates in animals can provide a more systematic view into the broad spectrum of pathologies that may result from aberrations in

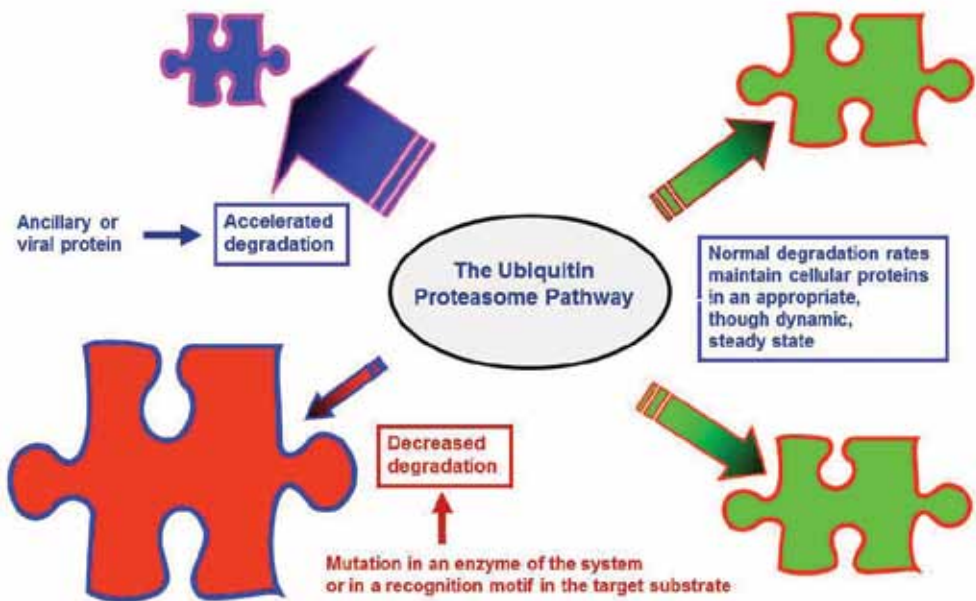


Fig. 8. Aberrations in the ubiquitin-proteasome system and pathogenesis of human diseases. Normal degradation of cellular proteins maintains them in a steady state level, though this level may change under various pathophysiological conditions (upper and lower right side). When degradation is accelerated due an increase in the level of an E3 (*Skp2* in the case of *p27*, for example), or overexpression of an ancillary protein that generates a complex with the protein substrate and targets it for degradation (the Human Papillomavirus E6 oncoprotein that associates with *p53* and targets it for degradation by the E6-AP ligase, or the cytomegalovirus-encoded ER proteins *US2* and *US11* that target MHC class I molecules for ERAD), the steady state level of the protein decreases (upper left side). A mutation in a ubiquitin ligase [such as occurs in Adenomatous Polyposis Coli - APC, or in E6-AP (Angelmans' Syndrome)] or in the substrate's recognition motif (such as occurs in β -catenin or in ENaC) will result in decreased degradation and accumulation of the target substrate

ubiquitin-mediated proteolysis. Better understanding of the processes and identification of the components involved in the degradation of key regulatory proteins will lead to the development of mechanism-based drugs that will target specifically only the involved proteins. While the first drug, a specific proteasome inhibitor is already on the market (80), it appears that one important hallmark of the new era we are entering now will be the discovery of novel drugs based on targeting of specific processes such as inhibiting aberrant Mdm2- or E6-AP-mediated accelerated targeting of the tumor suppressor p53 which will lead to regain of its lost function.

Many reviews have been published on different aspects of the ubiquitin system. The purpose of this article was to bring to the reader several milestones along the historical pathway along which the ubiquitin system has been evolved. For additional reading on the ubiquitin system, the reader is referred to numerous review articles written on the subject (for some older reviews, see for example Refs. 81, and 82). Some parts of this review, including several Figures, are based on another published review article (Ref. 83).

Acknowledgement

Research in the laboratory of Aaron Ciechanover is supported by grants from the Dr. Miriam and Sheldon G. Adelson Medical Research Foundation (AMRF), the Israel Science Foundation (ISF), and the Deutsche-Israeli Cooperation Program (DIP). This article is based on the Nobel Lecture delivered in Stockholm on December 8, 2004, and published in: *Ciechanover A. (2005). Les Prix Nobel*. The Nobel Foundation, Stockholm, Sweden. pp. 151-175. The article is published with permission of the Nobel Foundation©.

References

1. *Clarke H. T.* Impressions of an organic chemist in biochemistry // *Annu. Rev. Biochem.* – 1958. – **27**. – P. 1–14.
2. *Kennedy E. P.* Hitler's gift and the era of biosynthesis // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 42619–42631.
3. *Simoni R. D., Hill R. L., Vaughan M.* The use of isotope tracers to study intermediary metabolism: Rudolf Schoenheimer // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277** (issue 43). – P. e1–e3 (available on-line at: <http://www.jbc.org>).
4. *Schoenheimer R., Ratner S., Rittenberg D.* Studies in protein metabolism: VII. The metabolism of tyrosine // *J. Biol. Chem.* – 1939. – **127**. – P. 333–344.
5. *Ratner S., Rittenberg D., Keston A. S., Schoenheimer R.* Studies in protein metabolism: XIV. The chemical interaction of dietary glycine and body proteins in rats // *J. Biol. Chem.* – 1940. – **134**. – P. 665–676.
6. *Schoenheimer R.* *The Dynamic State of Body Constituents* / Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. – 1942.

7. Hogness D. S., Cohn M., Monod J. Studies on the induced synthesis of β -galactosidase in *Escherichia coli*: The kinetics and mechanism of sulfur incorporation // Biochim. Biophys. Acta. – 1955. – **16**. – P. 99–116.
8. de Duve C., Gianetto R., Appelmans F., Wattiaux R. Enzymic content of the mitochondria fraction // Nature (London). – 1953. – **172**. – P. 1143–1144
9. Gianetto R., de Duve C. Tissue fractionation studies 4 Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat liver particles // Biochem. J. 1955. – **59**. – P. 433–438.
10. Simpson M. V. The release of labeled amino acids from proteins in liver slices // J. Biol. Chem. – 1953. – **201**. – P. 143–154.
11. Mortimore G. E., Poso A. R. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply // Annu. Rev. Nutr. – 1987. – **7**. – P. 539–564.
12. Ashford T. P., Porter K. R. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes // J. Cell Biol. – 1962. – **12**. – P. 198–202.
13. Schimke R. T., Doyle D. Control of enzyme levels in animal tissues // Annual Rev. Biochem. – 1970. – **39**. – P. 929–976.
14. Goldberg A. L., St. John A. C. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2 // Annu. Rev. Biochem. – 1976. – **45**. – P. 747–803.
15. Segal H. L., Winkler J. R., Miyagi M. P. Relationship between degradation rates of proteins *in vivo* and their susceptibility to lysosomal proteases // J. Biol. Chem. – 1974. – **249**. – P. 6364–6365.
16. Haider M., Segal H. L. Some characteristics of the alanine-aminotransferase and arginase-inactivating system of lysosomes // Arch. Biochem. Biophys. – 1972. – **148**. – P. 228–237.
17. Dean R. T. Lysosomes and protein degradation. // Acta Biol. Med. Ger. – 1977. – **36**. – P. 1815–1820.
18. Müller M., Müller H., Holzer H. Immunochemical studies on catabolite inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. 1981. – **256**. – P. 723–727.
19. Holzer H. Proteolytic catabolite inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* // Revis. Biol. Celular. – 1989. – **21**. – P. 305–319.
20. Majeski A. E., Dice J. F. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy // Intl. J. Biochem. Cell Biol. – 2004. – **36**. – P. 2435–2444.
21. Cuervo A. M., Dice J. F. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases // J. Mol. Med. – 1998. – **76**. – P. 6–12.
22. Hayashi M., Hiroi Y., Natori Y. Effect of ATP on protein degradation in rat liver lysosomes // Nature New Biol. – 1973. – **242**. – P. 163–166.
23. Schneider D. L. ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes: Evidence for an ATP-driven proton pump // J. Biol. Chem. – 1981. – **256**. – P. 3858–3864.
24. de Duve C., Wattiaux R. Functions of lysosomes // Annu. Rev. Physiol. – 1966. – **28**. – P. 435–492.
25. Rabinovitz M., Fisher J. M. Characteristics of the inhibition of hemoglobin synthesis in rabbit reticulocytes by threo- α -amino- β -chlorobutyric acid // Biochim. Biophys. Acta. – 1964. – **91**. – P. 313–322.

26. Carrell R. W., Lehmann H. The unstable haemoglobin haemolytic anaemias // *Semin. Hematol.* – 1969. – **6**. – P. 116–132.
27. Huehns E. R., Bellingham A. J. (). Diseases of function and stability of haemoglobin // *Br. J. Haematol.* – 1969. – **17**. – P. 1–10.
28. Etlinger J. D., Goldberg A. L. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – **74**. – P. 54–58.
29. Hershko A., Heller H., Ganoth D., Ciechanover A. Mode of degradation of abnormal globin chains in rabbit reticulocytes. In: *Protein Turnover and Lysosome Function* (H. L. Segal & D. J. Doyle, eds.). – Academic Press, New York, 1978. – P. 149–169.
30. Knowles S. E., Ballard F. J. Selective control of the degradation of normal and aberrant proteins in Reuber H35 hepatoma cells // *Biochem J.* – 1976. – **156**. – P. 609–617.
31. Neff N. T., DeMartino G. N., Goldberg A. L. The effect of protease inhibitors and decreased temperature on the degradation of different classes of proteins in cultured hepatocytes // *J. Cell Physiol.* – 1979. – **101**. – P. 439–457.
32. Poole B., Ohkuma S., Warburton M. J. The accumulation of weakly basic substances in lysosomes and the inhibition of intracellular protein degradation // *Acta Biol. Med. Germ.* – 1977. – **36**. – P. 1777–1788.
33. Poole B., Ohkuma S., Warburton M. J. Some aspects of the intracellular breakdown of exogenous and endogenous proteins. In: *Protein Turnover and Lysosome Function* (H. L. Segal & D. J. Doyle, eds.). – Academic Press, New York, 1978. – P. 43–58.
34. Mandelstam J. Turnover of protein in growing and non-growing populations of *Escherichia coli* // *Biochem. J.* – 1958. – **69**. – P. 110–119.
35. Steinberg D., Vaughan M. Observations on intracellular protein catabolism studied *in vitro* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1956. – **65**. – P. 93–105.
36. Hershko A., Tomkins G. M. Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture: Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence // *J. Biol. Chem.* – 1971. – **246**. – P. 710–714.
37. Goldberg A. L., Kowit J. D., Etlinger J. D. Studies on the selectivity and mechanisms of intracellular protein degradation. In: *Proteolysis and physiological regulation* (D.W. Ribbons & K. Brew, eds.). – Academic Press, New York, 1976. – P. 313–337.
38. Ciechanover A., Hod Y., Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes // *Biochem. Biophys. Res. Common.* – 1978. – **81**. – P. 1100–1105.
39. Ciechanover A., Heller H., Elias S. *et al.* ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – **77**. – P. 1365–1368.
40. Hershko A., Ciechanover A., Heller H. *et al.* Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – **77**. – P. 1783–1786.

41. *Ciechanover A., Elias S., Heller H. et al.* Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes // *J. Biol. Chem.* – 1980. – **255**. – P. 7525–7528.
42. *Wilkinson K. D., Urban, M. K., Haas A. L.* Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes // *J. Biol. Chem.* – 1980. – **255**. – P. 7529–7532.
43. *Goldstein G.* Isolation of bovine thymim, a polypeptide hormone of the thymus // *Nature (London)*. – 1974. – **247**. – P. 11–14.
44. *Goldstein G., Scheid M., Hammerling U. et al.* Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1975. – **72**. – P. 11–15.
45. *Schlessinger D. H., Goldstein G., Niall H. D.* The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells // *Biochemistry*. – 1975. – **14**. – P. 2214–2218.
46. *Low T. L. K., Goldstein A. L.* The chemistry and biology of thymosin: amino acid analysis of thymosin $\alpha 1$ and polypeptide $\beta 1$ // *J. Biol. Chem.* – 1979. – **254**. – P. 987–995.
47. *Goldknopf I. L., Busch H.* Remarkable similarities of peptide fingerprints of histone 2A and non-histone chromosomal protein A24. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1975. – **65**. – P. 951–955.
48. *Goldknopf I. L., Busch H.* Isopeptide linkage between non-histone and histone 2A polypeptides of chromosome conjugate-protein A24 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1977. – **74**. – P. 864–868.
49. *Hunt L. T., Dayhoff M. O.* Amino-terminal sequence identity of ubiquitin and the non-histone component of nuclear protein A24 // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* – 1977. – **74**. – P. 650–655.
50. *Hershko A., Ciechanover A., Rose I. A.* Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown // *J. Biol. Chem.* – 1981. – **256**. – P. 1525–1528.
51. *Hershko A., Heller H.* Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1985. – **128**. – P. 1079–1086.
52. *Chau V., Tobias J. W., Bachmair A. et al.* A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short lived protein // *Science*. – 1989. – **243**. – P. 1576–1583.
53. *Ciechanover A., Ben-Saadon R.* N-terminal ubiquitination: More Protein substrates join in // *Trends Cell Biol.* – 2004. – **14**. – P. 103–106.
54. *Muratani M., Tansey W. P.* How the ubiquitin-proteasome system controls transcription // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – **4**. – P. 192–201.
55. *Zhang Y.* Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination // *Genes & Dev.* – 2003. – **17**. – P. 2733–2740.
56. *Osley M. A.* H2B ubiquitylation: the end is in sight // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2004. – **1677**. – P. 74–78.
57. *Lipman F.* Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis // *Science*. – 1971. – **173**. – P. 875–884.

58. Ciechanover A., Elias S., Heller H., Hershko A. "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzyme // *J. Biol. Chem.* – 1982. – **257**. – P. 2537–2542.
59. Hershko A., Heller H., Elias S., Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system: Resolution, affinity purification and role in protein breakdown // *J. Biol. Chem.* – 1983. – **258**. – P. 8206–8214.
60. Chin D. T., Kuehl L., and Rechsteiner M. Conjugation of ubiquitin to denatured hemoglobin is proportional to the rate of hemoglobin degradation in HeLa cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1982. – **79**. – P. 5857–5861.
61. Hershko A., Eytan E., Ciechanover A., Haas A. L. Immunochemical Analysis of the Turnover of Ubiquitin-protein Conjugates in Intact Cells: Relationship to the Breakdown of Abnormal Proteins // *J. Biol. Chem.* – 1982. – **257**. – P. 13964–13970.
62. Matsumoto Y., Yasuda H., Marunouchi T., Yamada M. Decrease in uH2A (protein A24) of a mouse temperature-sensitive mutant // *FEBS Lett.* – 1983. – **151**. – P. 139–142
63. Finley D., Ciechanover A., Varshavsky A. Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85 // *Cell.* – 1984. – **37**. – P. 43–55.
64. Ciechanover A., Finley D., Varshavsky A. Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85 // *Cell.* – 1984. – **37**. – P. 57–66.
65. Tanaka K., Waxman L., Goldberg A. L. ATP serves two distinct roles in protein degradation in reticulocytes, one requiring and one independent of ATP // *J. Cell Biol.* – 1983. – **96**. – P. 1580–1585.
66. Hershko A., Leshinsky E., Ganoth D., Heller H. ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1984. – **81**. – P. 1619–1623.
67. Hough R., Pratt G., Rechsteiner M. Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates // *J. Biol. Chem.* – 1986. – **261**. – P. 2400–2408.
68. Waxman L., Fagan J., Goldberg A. L. Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates // *J. Biol. Chem.* – 1987. – **262**. – P. 2451–2457.
69. Hough R., Pratt G., Rechsteiner M. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate // *J. Biol. Chem.* – 1987. – **262**. – P. 8303–8313.
70. Wilk S., Orlowski M. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme // *J. Neurochem.* – 1980. – **35**. – P. 1172–1182.
71. Eytan E., Ganoth D., Armon T., Hershko A. ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – **86**. – P. 7751–7755.
72. Driscoll J., Goldberg A. L. The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1,500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins // *J. Biol. Chem.* – 1990. – **265**. – P. 4789–4792.

73. Hoffman L., Pratt G., Rechsteiner M. Multiple forms of the 20S multicatalytic and the 26S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate // J. Biol. Chem. — 1992. — **267**. — P. 22362–22368.
74. Shanklin J., Jaben M., Vierstra R. D. Red light-induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: Identification of possible intermediates of phytochrome degradation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1987. — **84**. — P. 359–363.
75. Hochstrasser M., Varshavsky A. *In vivo* degradation of a transcriptional regulator: the yeast $\alpha 2$ repressor // Cell. — 1990. — **61**. — P. 697–708.
76. Scheffner M., Werness B. A., Huibregtse J. M. et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53 // Cell. — 1990. — **63**. — P. 1129–1136.
77. Glotzer M., Murray A. W., Kirschner M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway // Nature. — 1991. — **349**. — P. 132–138.
78. Ciechanover A., DiGiuseppe J. A., Bercovich B. et al. Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system *in vitro* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1991. — **88**. — P. 139–143.
79. Mizushima N., Noda T., Yoshimori T. et al. A protein conjugation system essential for autophagy // Nature. — 1998. — **395**. — P. 395–398.
80. Adams J. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer // Drug Discov. Today. 2003. — **8**. — P. 307–315.
81. Glickman M. H., Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: Destruction for the sake of construction // Physiol. Rev. — 2002. — **82**. — P. 373–428.
82. Pickart C. M., Cohen R. E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age // Nature Rev. Mol. Cell Biol. — 2004. — **5**. — P. 177–187.
83. Ciechanover A. From the lysosome to ubiquitin and the proteasome // Nature Rev. Mol. Cell Biol. — 2005. — **6**. — P. 79–86.

ON THE NOTION OF SYNERGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES AS DRUGS

Michael SELA

*Department of Immunology, The Weizmann Institute of Science,
Rehovot 76100, Israel;
e-mail: michael.sela@weizmann.ac.il*

Efforts to initiate a specific approach to immunotherapy of cancer started with the attachment of chemotherapeutic drugs by a weak covalent link to antitumor antibodies, at that stage still polyclonal [1–3]. Spacers such as dextran or polyglutamic acid were used to allow high drug load. At a later stage the antibodies were biotinylated, whereas the drug was attached to avidin, allowing a two stage drug targeting to the tumor [4]. During these experiments we noted that there was no need to covalently attach the drug to the antibody, which by itself had some antitumor activity. For example, when monoclonal antibodies (mAbs) to epidermal growth factor receptor (EGFR) were injected together with cisplatin [5] they exerted a strong synergistic effect on the ability to reduce the size of tumors (KB human epidermal carcinoma). This early observation, of a synergistic effect on cancer between an antibody and a chemotherapeutic drug, has paved the way for an extensively used clinical protocol [6].

To further explore ways to enhance therapeutic efficacy, we addressed the mechanism underlying tumor inhibition by mAbs to receptor tyrosine kinases such as EGFR/ErbB-1 and HER2/ErbB-2. One mechanism attributes tumor growth inhibition to the ability of anti-receptor mAbs to induce endocytosis and degradation of the receptors. The mAbs down-regulate the receptor leading to attenuated ligand-induced signaling potency and duration. To enhance antibody-mediated endocytosis of these cancer-causing receptors we introduced combinations of mAbs and found that epitope-distinct mAbs to the same receptor (homo-combination) can significantly enhance the rate of receptor breakdown in KB cells over-expressing EGFR [7]. Further, when combined, the mAbs synergize in terms of growth inhibition of N87 human gastric carcinoma over-expressing HER2 [8]. The combinations act in synergy if they are directed against distinct epitopes, i.e. sufficiently remote from each other on the receptor. The mAbs then cross-link the receptors and efficacy of immunotherapy is attributed to receptor cross-linking and size of antibody-receptor clusters formed at the cell surface. The clusters are rapidly removed, a step which dictates the rate of endocytic clearance, receptor down-regulation and extent of signaling blockade [6].

A mechanistically distinct approach simultaneously targets two different receptors, such as targeting both EGFR and HER2 (hetero-combination) or a receptor (e.g., HER2) and an anti-angiogenic growth factor (VEGF, using Avastin-bevacizumab). The extracellular domain of human ErbB presents adjacent or overlapping determinants harboring multiple antigenic sites. Depending on the site, a mAb can be dormant, propagate tumor growth or mediate a distinct detrimental effect. It can disturb ligand binding, interfere with heterodimer formation that induces signal transduction, or interfere with any other pathway not yet identified. Scientific rationale suggests that combining two mAbs to two epitopes on the same receptor, or two mAbs to the two receptors, can target different pathways. They may perturb the cancer cell by inducing a collaborative damage of simultaneously impaired functions often by differing but complementary mechanisms of action of the two mAbs.

While conducting experiments with various combinations of antibodies to HER2, we noted an interesting observation: an antibody which by itself exerted no effect on tumor growth in animals was nevertheless able to enhance the tumor-inhibitory effect of an otherwise weakly inhibitory mAb. Another interesting observation relates to the target epitopes. Our most effective mAb combinations always included an antibody directed to the dimerization arm of HER2, a region permitting HER2 to form heterodimers with EGFR and ErbB-3. Whether these observations can be generalized and applied to tumor markers other than HER2 is an intriguing issue, the elucidation of which requires additional investigation and broader repertoires of mAbs to HER2. The current challenge is to identify pathway-specific therapies and explore their potential additive or preferably synergistic effects, while avoiding excessive toxicities.

Our study was recently extended to human pancreatic carcinoma, a malignancy with extremely poor prognosis, which is largely considered incurable. We compared the effects of nine homo- and hetero-combinations of mAbs to EGFR or HER2, on the growth of human pancreatic carcinoma BXPC3 expressing moderate level of EGFR and low level of HER2. MAbs to the two receptors inhibited tumor growth in animals as single agents but acted in synergy and were more effective when paired in homo-combinations, exerting improved inhibition. Anti-HER2 mAbs, despite the low HER2 receptor, acted as important partners in collaborating with mAbs to EGFR to form highly inhibitory pairs. These hetero-combinations acted in synergy and were the most effective in generating long-term inhibitory activity.

The low effectiveness of therapeutic mAbs and the evolution of patient resistance call for deeper understanding of mechanisms that underlay immunotherapy. Because the superiority of mAb combinations extends to

tumor cell cultures, it may be assumed that in addition to cellular responses, non-immunological mechanisms also contribute to antibody synergy. Translation of these lessons to clinical applications may enhance patient response and delay acquisition of resistance.

References

1. Hurwitz E., Levy R., Maron R. *et al.* The covalent binding of daunomycin to antibodies with retention of both drug and antibody activities // *Cancer Res.* – 1975. – **35**. – P. 1175–1181.
2. Levy R., Hurwitz E., Maron R. *et al.* The specific cytotoxic effects of daunomycin conjugated to anti-tumor antibodies // *Cancer Res.* – 1975. – **35**. – P. 1182–1186.
3. Tsukada Y., Hurwitz E., Kashi R. *et al.* Chemotherapy by intravenous administration of conjugates of daunomycin with monoclonal and conventional anti-rat α -fetoprotein antibodies // *Proc. Natl. Acad. Acad. Sci. USA.* – 1982. – **79**. – P. 7896–7899.
4. Schechter B., Arnon R., Wilchek M. *et al.* Indirect immunotargeting of Cis-Pt to human epidermoid carcinoma KB using the avidin-biotin system // *Intl. J. Cancer.* – 1991. – **48**. – P. 167–172.
5. Aboud-Pirak E., Hurwitz E., Pirak M. E. *et al.* Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptors against KB carcinoma In vitro and in nude mice // *J. Nat. Cancer Inst.* – 1988. – **80**. – P. 1605–1611.
6. Yarden Y., Baselga J., Miles D. Molecular approach to breast cancer treatment // *Semin. Oncol.* – 2004. – **31**. – P. 6–13. Review.
7. Friedman L. M., Rinon A., Schechter B. *et al.* Synergistic down-regulation of receptor tyrosine kinases by combinations of monoclonal antibodies: implications for cancer immunotherapy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – **102**. – P. 1915–1920.
8. Ben-Kasus T., Schechter B., Lair S. *et al.* Persistent elimination of ErbB-2/HER-2-overexpressing tumors using combinations of monoclonal antibodies: relevance of receptor endocytosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – **106**. – P. 3294–3299.

ХРОМОСОМОЦЕНТРИЧНЫЙ ПОДХОД К ПРЕОДОЛЕНИЮ ТРУДНОСТЕЙ В РЕАЛИЗАЦИИ МЕЖДУНАРОДНОГО ПРОЕКТА «ПРОТЕОМ ЧЕЛОВЕКА»

А. И. АРЧАКОВ¹, В. Г. ЗГОДА¹, А. Т. КОПЫЛОВ¹, С. Н. НАРЫЖНЫЙ^{1,2},
А. Л. ЧЕРНОБРОВКИН¹, Е. А. ПОНОМАРЕНКО¹, А. В. ЛИСИЦА¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской
химии им. В. Н. Ореховича РАН, Россия;

²Петербургский институт ядерной физики Национального
исследовательского центра «Курчатовский институт», Россия

Международный проект «Протеом человека» (ППЧ), являющийся логическим продолжением проекта «Геном человека», начат 23 сентября 2010 года. В соответствии с геноцентричным подходом, целью ППЧ является подготовка каталога всех белков человека и расшифровка сети их взаимодействий. Трудности реализации ППЧ возникают вследствие того, что сам объект исследования — протеом — гораздо сложнее генома. Основной проблемой является недостаточная чувствительность протеомных методов, не позволяющая детектировать низко- и ультранизкокопийные белки. Плохая воспроизводимость протеомных методов и отсутствие так называемого «золотого» стандарта является второй основной сложностью в реализации ППЧ. Третья проблема — это динамичный характер протеома, его нестабильность во времени. В статье рассматриваются возможные варианты преодоления этих сложностей, препятствующих успешному выполнению ППЧ.

В 2010 году международная организация «Протеом человека» (Human Proteome Organization, HUPO) официально открыла глобальный проект «Протеом человека» (ППЧ). Первоочередной задачей проекта является выявление хотя бы одного белка, кодируемого каждым из 20300 генов человека [1]. С помощью количественной масс-спектрометрии (MS) и аффинных реагентов в рамках проекта планируется охарактеризовать внутриклеточную локализацию белков и основные модифицированные формы [2]. Хромосомотцентричная часть ППЧ (Chromosome-centric, C-HPP) направлена на расширение знаний о протеоме человека путем глубокого понимания роли каждого гена. Фундаментальные аспекты, связанные с возникновением и развитием патологических состояний и выявлением новых биологических маркеров, исследуются в рамках второй части ППЧ, ориентированной на заболевания (Biology/Disease, B/D-HPP). В последнее десятилетие в рамках реализации инициатив HUPO по исследованию протеома различных тканей и органов (протеом плаз-

мы, протеом печени, протеом мозга человека и др. [77]) были заложены основы для этой части проекта.

С 2008 года международной организацией «Протеом человека» организован и проведен ряд научных совещаний, посвященных вопросам определения целей, подходов и методических рекомендаций к реализации ППЧ [78, 3]. Планируется, что результатом выполнения I этапа проекта (длительностью 6 лет) с использованием масс-спектрометрических подходов будут идентифицированы основные (немодифицированные) белки человека в различных тканях; II этап ППЧ (длительностью 5 лет) направлен на идентификацию модифицированных белков, т.е. продуктов реализации однонуклеотидных полиморфизмов, а также белков, возникающих в ходе альтернативного сплайсинга или посттрансляционных модификаций.

Проект «Протеом человека» сравнивают с проектом «Геном человека» (ПГЧ), который был успешно завершен более десяти лет назад [4, 5]. Конечной целью ПГЧ было декодирование всего генома, последовательность которого контекстно независима и индивидуальна для человека. Секвенирование целого генома в начале 1990-х казалось нереальной задачей, и на проведение работ было потрачено в общей сложности около 3 млрд. долл. США (1 основание было секвенировано за 1 долл. США) [6, 7]. Реализация геномного проекта привела к развитию технологий [8], и сейчас за 1 доллар США может быть секвенировано уже 100 млн. оснований [9]. Секвенирование генома человека привело к получению продукта, востребованного на медицинском рынке и представляющего большую ценность для фундаментальных исследований. Тем не менее наши сегодняшние знания о функции генома ограничиваются в основном экспрессируемой частью, которая составляет не более 1,5% расшифрованной последовательности ДНК [10]. Создание аналогичного каталога белков в протеомике может стать хорошей основой для развития новых диагностических подходов и терапии [5].

По сравнению с геномными технологиями начала 1990-х современные протеомные технологии более перспективны [13], поскольку в одном эксперименте могут быть выявлены до 10 тыс. белков [14]. Тем не менее, реализация ППЧ сопряжена с рядом сложностей, которые будут рассмотрены далее. Эти сложности – недостаточная чувствительность протеомных технологий, отсутствие «золотого стандарта» и нестабильность протеома во времени – связаны с фундаментальными различиями геномики и протеомики.

Недостаточная чувствительность протеомных технологий.

Предел чувствительности аналитических методов

В геномных технологиях с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР, 15) одна молекула в биологическом образце может быть амплифицирована для повышения ее концентрации до предела обнаружения. В протеомике ситуация противоположная, поскольку пока нет технологии для репликации молекул белка, то основной проблемой реализации ППЧ является недостаточная чувствительность высокопроизводительных аналитических методов [16].

Наиболее чувствительные масс-спектрометрические детекторы могут обнаруживать аналит, присутствующий в концентрации до 10^{-18} молей на литр (М) [81]. Такая чувствительность оказывается достаточной для детекции белков, присутствующих в следовых количествах (менее 1000 молекул в 1 мкл образца), при этом в контексте биологических образцов предел чувствительности составляет 10^{-8} – 10^{-10} М, вследствие общей сложности и высокого динамического диапазона белков в биоматериале [17].

При исследовании протеома белки-мишени заранее не определены, поэтому пробоподготовка и фракционирование, влияющие на количество выявленных белков, даже более значимы, чем физические свойства масс-спектрометрических детекторов [18]. В 3D-экспериментах, которые обеспечивают всестороннее исследование протеома, белки в нативном биологическом образце сначала разделяются гель-фильтрацией [14] или изоэлектрическим фокусированием [19], после чего каждая фракция гидролизует трипсином и образующиеся при этом пептиды анализируются с помощью 2D-LC-MS/MS. Такой метод идентификации белков, известный также как метод «многомерной идентификации» (MudPIT), привел к быстрому переходу от обнаружения 100 полипептидов [20] к обнаружению тысяч белковых молекул.

При исследовании протеома дрожжей с использованием LC-MS/MS и ловушки масс-спектрометра ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье, были обнаружены примерно 2000 различных белков, при этом самый низкокопийный белок присутствовал в 100 копиях белка на клетку [21]. Учитывая, что клетка *Saccharomyces cerevisiae* составляет примерно 30 мкм^3 ($\sim 3 \times 10^{-14}$ л) [82], предел обнаружения одного белка в клетке соответствует концентрации 10^{-8} М. Пять лет спустя, группа под руководством Манна с использованием комбинированного подхода на базе Orbitrap/MudPIT идентифицировала 10000 белков в клеточных лизатах: миозин 5В (NeXtProt NX_Q9ULV0) был обнаружен на уровне примерно пяти копий на

1 клетку HeLa, что соответствует концентрации 5×10^{-13} М [14]. Зависимость количества идентифицированных белков от технологии пробоподготовки наблюдается также в протеомных экспериментах, выполненных по стратегии «top-down» [23, 24].

Вышеприведенные примеры показывают, что разделение белков является решающим фактором для проведения панорамных протеомных исследований, но при этом в настоящее время только 70% основных (мастерных) белков могут быть определены на протеомном уровне с использованием масс-спектрометрических подходов [1]; масштабное разделение увеличивает расход биоматериала, приводя к неизбежной потере аналитов. Альтернативный подход к повышению чувствительности MS основан на таргетных (целевых) методах.

Таргетная (целевая) протеомика

Предварительная информация для ППЧ может быть получена с использованием технологии MudPIT; детальная каталогизация протеома (последовательный анализ белков каждого гена) проводится с помощью таргетной (целевой) масс-спектрометрии [3]. Таргетный подход, основанный на масс-спектрометрическом методе мониторинга множественных реакций (МРМ), обеспечивает чувствительность до 10^{-14} М, позволяя обнаружить десятки белковых копий в дрожжевой клетке [25]. 47 различных белков в концентрации 1 мкг/мл (10^{-9} М) были обнаружены в плазме с помощью мультиплексного МРМ [26]. Группе под руководством Карра удалось достичь предела чувствительности до 1 нг/мл (10^{-12} М) с использованием меток стабильными изотопами (SID) и МРМ идентификации белков, добавленных в плазму крови человека [27]. Эта же группа применила МРМ метод для количественного определения среднекопийных белковых маркеров повреждения миокарда, в том числе, тропонинов [28]. Whiteaker с коллегами использовали антипептидные антитела, чтобы достичь предела обнаружения 10^{-12} М на 10 мкл плазмы и показали, что предел обнаружения в 10^{-15} М (пг/мл) возможен при обогащении пептидов из больших объемов плазмы (1 мл) [30]. Хотя SID-МРМ метод развивался как метод количественного анализа, он может быть использован и для выявления модифицированных белков в биологических образцах [31].

Начиная с измерения нескольких пептидных аналитов, таргетный подход быстро развивается. Сегодня компания Biognosys (Цюрих, Швейцария) предлагает количественный анализ 100 белков в одном МРМ методе, оптимизируя время удерживания протеотипических пептидов [83]. Данная компания оказывает содействие хранили-

щу МРМ данных [84], которые могут быть использованы для выбора так называемых «чрезвычайно успешных» (т.е. подходящих для MS) синтетических пептидов, чтобы разработать МРМ метод для анализа таргетных белков. Это достижение показывает, что потенциал МРМ метода далеко не исчерпан и его применение может обеспечить, фактически, неограниченные возможности для ППЧ.

Поскольку экспериментальный этап хромосомотричной части ППЧ связан с выявлением мастерных белков, то метод МРМ может быть применен для выявления одного за другим белков в биологическом образце [33]. При таком подходе используются методы биоинформатики для разработки *in silico* списка переходов, которые выбираются в качестве пиков с высоким уровнем ответа и воспроизводимости из перечня MS/MS фрагментов для исследуемого протеотипического пептида [26, 34]. Исходные переходы применяются для анализа биопробы в статическом режиме МРМ с использованием трех- и четырех- LC/MS. Оценка измерений может проводиться с использованием автоматизированных статистических инструментов [35], а идентификация пептида основана на значительном совпадении между списком исходных переходов и спектрами образцов [85]. Повторение статических экспериментов МРМ для нескольких (от двух до пяти) протеотипических пептидов белка позволяет компилировать несколько групп переходов с соответствующими временами удерживания в белокспецифический динамический МРМ-метод. Эти белокспецифические переходы затем объединяются в мультиплексный анализ и проверяются с применением биопробы, которая уже использовалась для разработки отдельных методов.

Преодоление термодинамического барьера с использованием необратимого связывания

В нашей лаборатории МРМ использовали для определения протеотипических пептидов, закодированных 18-й хромосомой немодифицированных белков в плазме крови, печени и экстрактах клеток линии HepG2 [36]. В настоящее время детектировано около 80% мастерных белков, кодируемых на этой хромосоме [86] при пределе обнаружения 10^{-15} М.

В нашем подходе мы исходим из предположения, что протеомные технологии ограничены обнаружением миллионов (в лучшем случае, тысяч) копий белков в биологическом материале. Теоретически успех в протеомике будет достигнут только тогда, когда концентрационный предел обнаружения понизится до уровня обнаружения одной молекулы в 1 л биоматериала (10^{-24} М), достигая обратного числа Авогадро (одна молекула на 1 л раствора) [16]. Предполагалось,

что чувствительность детектирования белка может быть увеличена с помощью необратимого химического связывания белков из больших объемов биоматериала. В серии экспериментов с применением атомно-силовой микроскопии и с использованием химического фишинга анализита с фотоактивированными антителами, нам удалось достичь уровня детекции 10^{-16} М против уровня 10^{-12} М, который наблюдается при обратимом связывании [37]. Дальнейшие эксперименты показали, что необратимое связывание белков с гранулами BrCN-Сефарозы, позволяет регистрировать протеотипические пептиды добавленных белков до уровня концентрации — 10^{-18} М, т. е. одна копия белка в 1 мкл плазмы крови.

Для решения проблем чувствительности и успешной реализации ППЧ, необходимо опираться на исследования транскриптома, в которых результаты выражаются не в единицах концентрации, а в количествах копий мРНК [38, 39]. Работая в диапазоне сверхнизких концентраций, удобно оперировать копиями белка, а не концентрациями, так как это позволяет сравнить результаты транскриптомных и протеомных экспериментов [40]. Хотя концентрации белка являются общепринятыми в протеомике [41], при чувствительности в моль/л, соответствующее количество копий белка может быть легко подсчитано как произведение LOD_{CV}/NRA , при объеме образца, V , и LOD — чувствительности метода измерения, N_{RA} — обратное число Авогадро, $\sim 10^{-24}$ [16]. Например, концентрация 10^{-18} М соответствует одной молекуле белка в 1 мкл, тогда как такая же концентрация в HepG2 клетке с объемом 10^{-13} л (каждая клетка имеет диаметр ~ 8 мкм) [42], приравнивается к 10^{-7} молекул в клетке, т. е. одна молекула белка на 10 миллиардов клеток. Поскольку одна копия белка в объеме HepG2 клетки соответствует концентрации 10^{-13} М, достигаемой современными масс-спектрометрическими методами, то для клеточной протеомики дальнейшее повышение чувствительности не требуется. Эта гипотеза была бы верна, если бы в масс-спектрометр можно было загрузить одну клетку; в реальности требуются тысячи и даже миллиарды клеток для получения белков в количествах, достаточных для масс-спектрометрических измерений. В обычном исследовании с использованием двумерного электрофореза Zappacosta с коллегами показали, что необходимо минимум 200 фмолей белка (2×10^8 клеток для детекции белка, присутствующего в 100 копиях/клетку) [43]. Для исследования протеома одной клетки, необходимо достичь чувствительности уровня одной молекулы белка на десятки тысяч или даже миллионов клеток. Такая чувствительность позволяет произвести инвентаризацию протеома отдельного органа, например: 1 г печени содержит 129 миллионов клеток [44], поэтому одна

копия белка на 10 миллионов клеток нередкое явление в масштабе органа.

В завершение обсуждения чувствительности протеомных методов, следует отметить, что число видов белка, присутствующих в конкретном клеточном материале и биологических жидкостях, остается неизвестным. В клетке предполагается снижение динамического диапазона концентраций белка в противоположность плазме крови, которая имеет исключительный динамический диапазон — более 10 порядков [17]. Высокий динамический диапазон означает, что плазма представляет собой сложную смесь разнообразных белков из различных тканей и клеток [45]. При том, что любой белок теоретически может присутствовать в плазме, экспериментально в ней обнаружено всего несколько тысяч белков [46]. Мы сообщали об экспериментальном подходе к оценке числа видов белка, присутствующих в плазме [37], согласно которому белки в биопробе разделялись 2D-электрофорезом и визуализировались окрашиванием различной чувствительности в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-12} М. Используя этот метод, подсчитано, что протеом плазмы теоретически состоит примерно из 10^6 различных типов белков.

Отсутствие «золотого стандарта»

Соответствие между чувствительностью аналитического метода и количеством детектируемых белков является основой для разработки нового подхода к протеомной стандартизации. На основании экспертной оценки, хромосома-центричная парадигма (по крайней мере на первом этапе) позволит обойти проблему низкой воспроизводимости и ошибочных идентификаций белка.

Традиционно проблема стандартизации в протеомике основывается на нескольких очевидных соображениях [13, 47]. В соответствии с концепцией масштабирования протеомики для сохранения воспроизводимости и чувствительности необходимо руководствоваться стандартными рабочими процедурами (standart operating procedures — SOP) и преаналитическим контролем процессов [48]. SOP должны объединить отбор образцов и условия хранения клинических образцов. Например, для спинномозговой жидкости была показана существенная потеря всех A- β пептидов при замораживании образцов [49]. Стандартизация образцов ткани, полученных посмертно или с помощью биопсии, является еще более сложной задачей, поскольку изменения в ткани могут происходить уже через 20 мин после забора образца. Для решения проблемы изменчивости тканей, Espina и Muller предложили универсальный фиксирующий раствор для ста-

билизации и сохранения белков, нуклеиновых кислот и тканевой структуры [50].

Сильная вариабельность наблюдается и при аналитическом этапе обработки образцов, где для достижения более высокой чувствительности и увеличения покрытия протеома исследователи изменяют уже опубликованные протоколы. Влияние пробоподготовки, префракционирования, хроматографии и методов MS при анализе образцов ткани и клеточных лизатов были рассмотрены в работе Altelaar и Heck [51]. Использование сортировки флуоресцентно активированных клеток, лазерной микродиссекции, предварительного разделения методом SDS-PAGE и прямого LC-MS анализа в эксперименте позволяет варьировать такими параметрами как необходимое количество биоматериала и число обнаруженных белков. В зависимости от применяемого протеомного метода и от количества обработанного биоматериала, число идентифицируемых белков изменилось с 1006 до 6664 видов (белка).

Таргетные методы на базе MRM (multiple reaction monitoring) обладают высокой воспроизводимостью, что существенно облегчает решение вопроса стандартизации их применения. В Национальном институте рака (Мериленд, США), было проведено исследование «Multilab», целью которого являлась оценка воспроизводимости и надежности SID-MRM-MS метода для определения количества пептидов и белков в плазме человека [52]. Семь различных белков использовались в качестве добавленных зондов в девяти концентрациях; каждая концентрация зонда измерялась в трех технических повторах. Внутри- и межлабораторная изменчивость результатов измерений оценивалась по коэффициенту вариации (CV) со значением ниже 25%. На основе полученных результатов приведенного исследования был сделан вывод, что таргетный подход обеспечивает выполнение воспроизводимого измерения белков, присутствующих в концентрациях от высоких до средних (выше 10^{-8} M) в нефракционированной плазме с линейным динамическим диапазоном в три порядка. Однако, несмотря на последующий строгий SOP, несколько сигнатур пептидов не были обнаружены в MRM анализе, указывая на то, что этот метод (как и другие) зависит от обработки проб, включая фракционирование, обессоливание и неполное ферментативное расщепление [52].

Различия в MS/MS поисковых алгоритмах и базах данных аминокислотных последовательностей являются источником общих несоответствий в перечне идентификаций белков. В сравнительном исследовании оценивались пять наиболее популярных алгоритмов поиска MS/MS спектров белков в плазме крови с использованием

лабораторного справочно-информационного фонда (СИФ) против базы данных последовательности Международного индекса белка (IPI) [53]. В зависимости от поискового механизма, было обнаружено 526 пептидных идентификаций и лишь 335 (63%) из них были точно определены на основе консенсуса четырех алгоритмов, хотя все исходные спектры были сгенерированы в одной лаборатории. Последующее MultiLab исследование было выполнено с использованием контрольного образца (эквимоллярная смесь из 20 белков) и MS/MS спектров, полученных ведущими протеомными лабораториями [54]. Несмотря на относительно простую смесь белков, присутствующих в сравнительно высоких концентрациях (10^{-10} – 10^{-12} М в зависимости от разведения сухих контрольных образцов), только семь, из 27 лабораторий правильно определили все 20 белков. Централизованный анализ результатов позволил сделать вывод, что большинство лабораторий получают высококачественные MS данные для выявления всех 20 белков и выявленные несоответствия, скорее всего, вызваны различиями между алгоритмами анализа и базами данных.

Нестабильность базы данных последовательностей является еще одним источником несоответствий при идентификации белков, полученных с помощью MS. Проблема рассматривалась в отношении четырех самых популярных баз данных: IPI, UniProtKB, NCBItrg и Ensemble [55], где наибольшей стабильностью обладает UniProtKB, тогда как изменения идентификаторов белка в IPI отмечается примерно в 10% случаев.

Основной пример использования стандартизации можно наблюдать в проекте ПППЧ (Проект «Протеом плазмы крови человека»), в рамках которого был разработан подход для решения проблем, возникающих при сборе, интеграции, анализе и распространении полученных данных во всем мире [56]. Суть данного подхода состоит в развитии модели данных, инструктирующих выполнение принятых рекомендаций для получения и дальнейшей публикации данных идентификации пептидов и белков [57]. В соответствии с моделью данных был создан репозиторий, удовлетворяющий конкретным требованиям проекта. Такое строгое управление данными в результате позволило получить в рамках ПППЧ список из 3024 многопептидных идентификаций белка в плазме крови человека, который стал справочником для различных типов анализа [58].

Наработки ПППЧ и результаты исследования опытного образца, полученные группой под руководством Bell, рекомендованного НУРО, показывают, что стандартизация может стать «узким местом» для ППЧ [46, 54]. По нашему мнению, участники международного проекта ППЧ должны сосредоточиться на решении проблемы стан-

дартизации, используя имеющиеся возможности протеома [59], а не стандартизируя методы исследования протеома, как это предлагается сегодня.

Хромосоמו-центричный подход дает возможность пересмотреть концепцию стандартизации, так как при его использовании следует учитывать только чувствительность аналитического метода и общее количество белка, взятого для анализа из биологического образца. Данные, представленные в работе Арчакова с соавт. [37] для 2DE, позволили нам предложить следующую формулу (см. дополнительные данные 3), выражающую число белковых видов в образце (N) как функцию двух параметров: LOD (limit of detection) и количество белка в пробе (Q), введенные для выполнения аналитической процедуры; выглядят следующим образом:

$$N = \frac{a * Q}{LOD^b}, \quad (1)$$

где коэффициенты a и b зависят от типа биоматериала (например, $a = 6,4 \times 10^{-3}$ и $b = 0,47$ для плазмы крови, или $a = 4,3 \times 10^{-5}$ и $b = 0,79$ для HepG2 клеток). Конечно, формула также зависит от типа протеомной технологии.

LOD была предложена в качестве меры чувствительности протеомных технологий, выраженной в виде нижней границы определяемой концентрации белка [16]. На основании формулы (1), можно сделать несколько предположений: например, снижение LOD приводит к идентификации большего числа видов белка, а именно:

если $LOD_1 < LOD_2$, то $N_1 > N_2$.

В противном случае, увеличивая количество биоматериала, можно получить больше видов белка:

если $Q_1 > Q_2$, то $N_1 > N_2$.

Ожидается также, что, используя метод с максимальным физически релевантным LOD (т. е. одна молекула белка на 1 л), можно рассчитать общее число видов белка при условии отсутствия ограничений в количестве образца, а именно:

$$N \rightarrow N_{\max} \text{ at } LOD \rightarrow 0 \text{ и } Q \rightarrow \infty. \quad (2)$$

Методы, используемые для идентификации белков при хромосоמוцентричном подходе, тоже можно сравнивать, указывая LOD и количество белка в образце Q . Мера стандартизации может быть корректно формализована как вероятность аналитического метода для расшифровки N белков в определенном типе биоматериала. Точность

эксперимента будет выражена количественно в виде отклонения полученного значения N от ожидаемого значения, рассчитанного по формуле (1), учитывая значения LOD (характеристика аналитического канала информации) и Q (характеристика плана эксперимента).

Мы ожидаем, что хромосоמו-центричный подход даст нам возможность рассматривать проблему «золотого стандарта» под новым углом зрения. Например, число репрезентативных основных белков, кодируемых генами хромосомы 18, в настоящее время составляет около 280 [60]. На начальном этапе, не следует сосредоточиваться на выявлении всех белков, кодируемых хромосомой, поскольку не все последовательности экспрессируются и чувствительность современных методов ограничена [16, 41]. При использовании стандартных аналитических методов (на основе использования антител/MS-технологий), протокол должен обеспечивать воспроизводимое детектирование в конкретном образце биоматериала, по крайней мере, порядка 80% белков, кодируемых определенной хромосомой.

Протеомика – ситуационная наука

Принято считать, что протеом здорового человека динамически изменяется с течением времени. На основании этого можно предположить зависимость результатов экспериментов, как правило, от внешних факторов, влияющих на субъект исследования [47]. Удивительно, но до настоящего времени систематические протеомные исследования для подтверждения степени индивидуальных вариаций уровня белка в плазме крови человека или в тканях человека – не проводились. Идея индивидуальной изменчивости протеома была заимствована из молекулярной физиологии и спортивной медицины, где изучался ответ здоровых людей, испытываемых на внешние раздражители. Большинство выводов было сделано по результатам исследований регуляторных молекул: изменения цистатионина плазмы после завтрака [61], изменения в системе фактора I роста инсулина в условиях острого дефицита энергии [62], изменения в моделях подкласса липопротеинов низкой плотности после диеты с пониженным содержанием жира у мужчин [63] и многие другие. В исследованиях, связанных с измерением одиночного белка плазмы – транстиретина, было показано, что его уровень может измениться в ответ на 30-минутное воздействие высокочастотного электромагнитного поля, создаваемого сотовыми телефонами [64]. Однако авторы согласились с тем, что наблюдаемые изменения в уровне белков плазмы также могли быть вызваны стрессом, который добровольцы испытали во время забора крови. Изучение влияния микрогравитации на здоровых добровольцев, показал удвоение уровня экспрессии $\beta 2$ -интегринов в

нейтрофилах периферической крови через 65 дней после положения тела головой вниз, а после окончания гипокинезии – вернулся к исходному уровню [65]. Степень экспрессии белка в ткани тоже может меняться: например, уровень определенных белков, полученных из пинеальной железы крысы показывает более чем пятикратные циркадные изменения [66]. С другой стороны, результаты высокопроизводительных LC-MS/MS экспериментов на мышах не показали существенных различий в протеоме мозга, обусловленных старением [67].

Немногие имеющиеся факты об изменениях транскриптома отдельного человека предполагают соответствующую динамичность протеома. Данных об мультибелковых исследованиях изменений протеома у млекопитающих опубликовано немного. На основании обзора исследований с применением 2-DE для анализа плазмы крови был сделан вывод, что изменения яркости светового пятна в здоровой контрольной группе сопоставимы с изменением при болезни в сравнении с контрольной оценкой [69]. Corzett с соавт. изучили изменения протеома плазмы крови человека с использованием 2-D DIGE и отметили, что CV изменялся от 10 до 90% со средним значением 23% при субъект-объектном анализе и лишь 21 пятно белков имело CV > 50% [70]. Индивидуальное изменение характеризовалось средней CV 10%, которое сопоставимо с техническими изменениями по сообщению авторов [71].

Мета-анализ литературы выявил разницу на два порядка в оценке копияности белков плазмы для здоровых людей [72]. В 150 многокопийных белках плазмы с диапазоном концентраций от 10^{-3} до 10^{-8} М уровень большинства белков изменялся в два–три раза, но при этом присутствовали и высокодинамичные виды, такие как лизоцим, который изменялся от 10^{-6} до 10^{-8} М.

Основываясь на вышесказанном, третья проблема ППЧ становится очевидной: протеомика зависит от ситуации, где только одна последовательность генома может быть (условно) представлена в виде контекстно независимой единицы. Последовательность генома является цифровым продуктом, который может быть предложен человеку и, однажды предоставленный, он сохраняет свое значение на длительное время. Например, американская компания 23andMe (Калифорния, США) продвигает высокопилотное генотипирование отдельных геномов, чтобы обеспечить заказчика своевременным обновлением информации, связанной с медицинским воздействием вновь открытых мутаций у населения [88].

Такой подход неприменим к протеому человека, так как невозможно получить протеом в виде постоянного снимка, неизменного

в своем значении. Вместо этого участники ППЧ должны сосредоточиться на разработке технологии «кадрового фильма» [73]. Такой «фильм» будет информативен, если хромосомотцентричный подход предполагает углубленное изучение аберрантных функций, продиктованное полиморфизмами, мутациями, изоформами или модификацией состояния белков [13]. Применяя таргетный подход, при котором особое внимание уделяется ограниченному набору разработанных белков, можно будет проследивать временной паттерн протеома [74].

На самом деле ожидаемая изменчивость протеома способствует развитию пилотной фазы ППЧ, так как некоторые недостающие белки могут быть выявлены путем сбора образцов внутри и между субъектами. Проблему ППЧ, связанную с изменчивостью протеома, можно решить обычным путем, если начать с отбора контрольной группы лиц, тщательно проверенных современными клиническими методами. Для русской части проекта [36] мы используем группу здоровых добровольцев, выдержавших жесткие условия аэрокосмической программы [75]. Таким способом можно вывести средний протеом плазмы, характерный для «абсолютного здоровья». Альтернативный подход состоит в осмотре относительно здоровых людей, не имеющих явных патологических показаний [71, 76]. Средний протеом плазмы крови человека можно суммировать по данным этой группы, аналогично многим исследованиям, включая крупномасштабный ПППЧ [46].

При любом из этих подходов должна быть выполнена осевая выборка с использованием индивидуального «внутреннего контроля» [74]. Сканирование временных изменений позволит проводить более чувствительные эксперименты, которые могут привести к открытию биомаркеров более эффективно, чем при простом сравнении одиночных образцов, полученных при исследовании групп сильно непохожих людей [73, 76]. С развитием MRM методов для нефракционированной плазмы [52], мультиплексный анализ белков-мишеней будет методом выбора для исследования изменчивости протеома при достаточно высоком уровне чувствительности.

Итак, три проблемы — «узкие места» в протеомных технологиях, а именно: чувствительность, отсутствие «золотого стандарта» и динамичность в копияности белков, должны быть решены в рамках реализации ППЧ. В зависимости от успехов в преодолении этих «узких мест», выполнение ППЧ позволит внести существенный практический вклад в развитие медицины.

Благодарность

Работа выполнена в рамках программы «Протеом человека» Российской академии медицинских наук при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 8274).

CHROMOSOMOCENTRIC APPROACH TO OVERCOMING DIFFICULTIES IN IMPLEMENTATION OF INTERNATIONAL PROJECT *HUMAN PROTEOME*

A. I. Archakov¹, V. G. Zgoda¹, A. T. Kopylov¹, S. N. Naryzhny^{1,2},
A. L. Chernobrovkin¹, E. A. Ponomarenko¹, A. V. Lisitsa¹

¹V. N. Orekhovich Scientific-Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Russia;

²Petersburg Nuclear Physics Institute at National Research Centre *Kurchatov Institute*, Russia

The international project *Human Proteome* (PHP), being a logical continuation of the project *Human Genome*, was started on September 23, 2010. In correspondence with the genocentric approach, the PHP aim is to prepare a catalogue of all human proteins and to decipher a network of their interactions. The PHP implementation difficulties arise because the research subject itself – proteoma – is much more complicated than genome. The major problem is the insufficient sensitivity of proteome methods that does not allow detecting low- and ultralow-copy proteins. Bad reproducibility of proteome methods and the lack of so-called «gold» standard is the second major complicacy in PHP implementation. The third problem is the dynamic character of proteome, its instability in time. The paper deals possible variants of overcoming these complicacies, preventing from successful implementation of PHP.

Литература

1. Legrain P., Aebersold R., Archakov A. et al. The human proteome project: current state and future direction // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2011. – **10**. – M111.009993.
2. Paik Y-K., Jeong S-K., Omenn G. S. et al. The Chromosome-Centric Human Proteome Project for cataloging proteins encoded in the genome // *Nature Biotechnol.* – 2012. – **30**. – P. 221–223.
3. Paik Y-K., Omenn G. S., Uhlen M. et al. Standard guidelines for the chromosome-centric human proteome project // *J. Proteome Res.* – 2012. – **11**. – P. 2005–2013.
4. *The big ome* // *Nature*. – 2008. – **452**. – P. 913–914.
5. *A gene-centric human proteome project: HUPO – the Human Proteome organization* // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2010. – **9**. – P. 427–429.

6. Lander E. S., Linton L. M., Birren B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature*, 409, 860–921 (2001).
7. Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W. et al. The sequence of the human genome // *Science* (New York, NY). – 2001. – **291**. – P. 1304–1351.
8. Voelkerding K. V., Dames S. A., Durtschi J. D. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics // *Clin. Chem.* – 2009. – **55**. – P. 641–658.
9. Snyder M., Du J., Gerstein M. Personal genome sequencing: current approaches and challenges // *Genes Dev.* – 2010. – **24**. – P. 423–431.
10. Tejedor J. R., Valcárcel J. Gene regulation: Breaking the second genetic code // *Nature*. – 2010. – **465**. – P. 45–46.
11. Via M., Gignoux C., Burchard E. G. The 1000 Genomes Project: new opportunities for research and social challenges // *Genome Medicine*. – 2010. – **2**. – P. 3.
12. Rosenbloom K. R., Dreszer T. R., Pheasant M. et al. ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – **38**. – D620–5.
13. Nilsson T., Mann M., Aebersold R. et al. Mass spectrometry in high-throughput proteomics: ready for the big time // *Nature Methods*. – 2010. – **7**. – P. 681–685.
14. Nagaraj N., Wisniewski J. R., Geiger T. et al. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line // *Mol. Syst. Biol.* – 2011. – **7**. – P. 548.
15. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (New York, NY), 239, 487–91 (1988).
16. Archakov A. I., Ivanov Y. D., Lisitsa A. V., Zgoda V. G. AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics // *Proteomics*. – 2007. – **7**. – P. 4–9.
17. Anderson N. L., Anderson N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2002. – **1**. – P. 845–867.
18. Zgoda V. G., Moshkovskii S. A., Ponomarenko E. A. et al. Proteomics of mouse liver microsomes: performance of different protein separation workflows for LC-MS/MS // *Proteomics*. – 2009. – **9**. – P. 4102–4105.
19. Malmström J., Lee H., Nesvizhskii A. I. et al. Optimized peptide separation and identification for mass spectrometry based proteomics via free-flow electrophoresis // *J. Proteome Res.* – 2006. – **5**. – P. 2241–2249.
20. Washburn M. P., Wolters D., Yates J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology // *Nature Biotechnol.* – 2001. – **19**. – P. 242–247.
21. de Godoy L. M. F., Olsen J. V., de Souza G. A. et al. Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system // *Genome Biol.* – 2006. – **7**. – R50.
22. Klose J. From 2-D electrophoresis to proteomics // *Electrophoresis*. – 2009. – **30**, Suppl. 1. P. S142–9.
23. Nedelkov D., Kiernan U. A., Niederkofler E. E. et al. Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2006. – **5**. – P. 1811–1818.

24. *Tran J. C., Zamdborg L., Ahlf D. R. et al.* Mapping intact protein isoforms in discovery mode using top-down proteomics // *Nature*. – 2011. – **480**. – P. 254–258.
25. *Kiyonami R., Schoen A., Prakash A. et al.* Increased selectivity, analytical precision, and throughput in targeted proteomics // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2011. – **10**. – M110.002931.
26. *Anderson L., Hunter C. L.* Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2006. – **5**. – P. 573–588.
27. *Keshishian H., Addona T., Burgess M. et al.* Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2007. – **6**. – P. 2212–2229.
28. *Keshishian H., Addona T., Burgess M. et al.* Quantification of cardiovascular biomarkers in patient plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2009. – **8**. – P. 2339–2349.
29. *Stahl-Zeng J., Lange V., Ossola R. et al.* High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2007. – **6**. – P. 1809–1817.
30. *Whiteaker J. R., Zhao L., Anderson L., Paulovich A. G.* An automated and multiplexed method for high throughput peptide immunoaffinity enrichment and multiple reaction monitoring mass spectrometry-based quantification of protein biomarkers // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2010. – **9**. – P. 184–196.
31. *Unwin R. D., Griffiths J. R., Leverentz M.K. et al.* Multiple reaction monitoring to identify sites of protein phosphorylation with high sensitivity // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2005. – **4**. – P. 1134–1144.
32. *Unwin R. D., Griffiths J. R., Whetton A. D.* A sensitive mass spectrometric method for hypothesis-driven detection of peptide post-translational modifications: multiple reaction monitoring-initiated detection and sequencing (MIDAS) // *Nat. Protoc.* – 2009. – **4**. – P. 870–877.
33. *Berle M., Kroksveen A. C., Haaland O. A. et al.* Protein profiling reveals inter-individual protein homogeneity of arachnoid cyst fluid and high qualitative similarity to cerebrospinal fluid // *Fluids and Barriers of the CNS*. – 2011. – **8**. – P. 19.
34. *Sherwood C. A., Eastham A., Lee L. W. et al.* MaRiMba: a software application for spectral library-based MRM transition list assembly // *J. Proteome Res.* – 2009. – **8**. – P. 4396–4405.
35. *Reiter L., Rinner O., Picotti P. et al.* mProphet: automated data processing and statistical validation for large-scale SRM experiments // *Nat. Methods*. – 2011. – **8**. – P. 430–435.
36. *Archakov A., Aseev A., Bykov V. et al.* Gene-centric view on the human proteome project: the example of the Russian roadmap for chromosome 18 // *Proteomics*. – 2011. – **11**. – P. 1853–1856.
37. *Archakov A., Ivanov Y., Lisitsa A., Zgoda V.* Biospecific irreversible fishing coupled with atomic force microscopy for detection of extremely low-abundant proteins // *Proteomics*. – 2009. – **9**. – P. 1326–1343.

38. Wang Z., Gerstein M., Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics // *Nat. Rev. Genet.* – 2009. – **10**. – P. 57–63.
39. Taniguchi Y., Choi P. J., Li G-W. et al. Quantifying *E. coli* Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells // *Science.* – 2010. – **329**. – P. 533–538.
40. Schwanhäusser B., Busse D., Li N. et al. Global quantification of mammalian gene expression control // *Nature.* – 2011. – **473**. – P. 337–342.
41. Anderson N. L., Anderson N. G., Pearson T. W. et al. A human proteome detection and quantitation project // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2009. – **8**. – P. 883–886.
42. Dandoy P., Meunier C. F., Michiels C., Su B-L. Hybrid shell engineering of animal cells for immune protections and regulation of drug delivery: towards the design of “artificial organs” // *PloS One.* – 2011. – **6**. – e20983.
43. Zappacosta F., Huddleston M. J., Karcher R. L. et al. Improved sensitivity for phosphopeptide mapping using capillary column HPLC and microionspray mass spectrometry: comparative phosphorylation site mapping from gel-derived proteins // *Anal. Chem.* – 2002. – **74**. – P. 3221–3231.
44. Marcos R., Monteiro R. A. F, Rocha E. Design-based stereological estimation of hepatocyte number, by combining the smooth optical fractionator and immunocytochemistry with anti-carcinoembryonic antigen polyclonal antibodies // *Liver Int.* – 2006. – **26**. – P. 116–124.
45. Shen Y., Kim J., Strittmatter E. F. et al. Characterization of the human blood plasma proteome // *Proteomics.* – 2005. – **5**. – P. 4034–4045.
46. Omenn G. S., States D. J., Adamski M. et al. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database // *Proteomics.* – 2005. – **5**. – P. 3226–3245.
47. Hamacher M., Meyer H. E. HUPO Brain Proteome Project: aims and needs in proteomics // *Expert Rev. Proteomics.* – 2005. – **2**. – P. 1–3.
48. Migneault I., Hunter J. M. Industrialized MS-based proteomics in the search for circulating biomarkers // *Bioanalysis.* – 2009. – **1**. – P. 149–1163.
49. Bibl M., Esselmann H., Otto M. et al. Cerebrospinal fluid amyloid beta peptide patterns in Alzheimer’s disease patients and nondemented controls depend on sample pretreatment: indication of carrier-mediated epitope masking of amyloid beta peptides // *Electrophoresis.* – 2004. – **25**. – P. 2912–2918.
50. Espina V., Mueller C. Reduction of preanalytical variability in specimen procurement for molecular profiling // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – **823**. – P. 49–57.
51. Altelaar A. M., Heck A. J. Trends in ultrasensitive proteomics // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2012. – **16**. – P. 206–213.
52. Addona T. A., Abbatiello S. E., Schilling B. et al. Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma // *Nat. Biotechnol.* – 2009. – **27**. – P. 633–641.
53. Kapp E. A., Schütz F., Connolly L. M. et al. An evaluation, comparison, and accurate benchmarking of several publicly available MS/MS search

- algorithms: sensitivity and specificity analysis // *Proteomics*. – 2005. – **5**. – P. 3475–3490.
54. *Bell A. W., Deutsch E. W., Au C. E. et al.* A HUPO test sample study reveals common problems in mass spectrometry-based proteomics // *Nat. Methods*. – 2009. – **6**. – P. 423–430.
55. *Griss J., Côté R. G., Gerner C. et al.* Published and perished? The influence of the searched protein database on the long-term storage of proteomics data // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2011. – **10**. – M111.008490.
56. *Adamski M., Blackwell T., Menon R. et al.* Data management and preliminary data analysis in the pilot phase of the HUPO Plasma Proteome Project // *Proteomics*. – 2005. – **5**. – P. 3246–3261.
57. *Carr S., Aebersold R., Baldwin M. et al.* The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data: Working Group on Publication Guidelines for Peptide and Protein Identification Data // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2004. – **3**. – P. 531–533.
58. *Klie S., Martens L., Vizcaino J. A. et al.* Analyzing large-scale proteomics projects with latent semantic indexing // *J. Proteome Res.* – 2008. – **7**. – P. 182–191.
59. *Geiger T., Wehner A., Schaab C. et al.* Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2012. – **11**. – M111.014050.
60. *The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010* // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – **38**. – P. D142–8.
61. *Guttormsen A. B., Solheim E., Refsum H.* Variation in plasma cystathionine and its relation to changes in plasma concentrations of homocysteine and methionine in healthy subjects during a 24-h observation period // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – **79**. – P. 76–79.
62. *Aleman J. A., Nindl B. C., Kellogg M. D. et al.* Effects of dietary protein content on IGF-I, testosterone, and body composition during 8 days of severe energy deficit and arduous physical activity // *J. Appl. Physiol.* – 2008. – **105**. – P. 58–64.
63. *Dreon D. M., Fernstrom H. A., Miller B., Krauss R. M.* Low-density lipoprotein subclass patterns and lipoprotein response to a reduced-fat diet in men // *FASEB J.* – 1994. – **8**. – P. 121–126.
64. *Yuasa K., Arai N., Okabe S. et al.* Effects of thirty minutes mobile phone use on the human sensory cortex // *Clin. Neurophysiol.* – 2006. – **117**. – P. 900–905.
65. *Choukèr A., Thiel M., Baranov V. et al.* Simulated microgravity, psychic stress, and immune cells in men: observations during 120-day 6 degrees HDT // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – **90**. – P. 1736–1743.
66. *Møller M., Sparre T., Bache N. et al.* Proteomic analysis of day-night variations in protein levels in the rat pineal gland // *Proteomics*. – 2007. – **7**. – P. 2009–2018.
67. *Walther D. M., Mann M.* Accurate quantification of more than 4000 mouse tissue proteins reveals minimal proteome changes during aging // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2011. – **10**. – M110.004523.

68. *Sonna L. A., Fujita J., Gaffin S. L., Lilly C. M.* Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression // *J. Appl. Physiol.* – 2002. – **92**. – P. 1725–1742.
69. *Trifonova O., Larina I., Grigoriev A. et al.* Application of 2-DE for studying the variation of blood proteome // *Expert Rev. Proteomics.* – 2010. – **7**. – P. 431–438.
70. *Corzett T. H., Fodor I. K., Choi M. W. et al.* Statistical analysis of variation in the human plasma proteome // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2010. – **2010**. – 258494.
71. *Corzett T. H., Fodor I. K., Choi M. W. et al.* Statistical analysis of the experimental variation in the proteomic characterization of human plasma by two-dimensional difference gel electrophoresis // *J. Proteome Res.* – 2006. – **5**. – P. 2611–2619.
72. *Hortin G. L., Sviridov D., Anderson N. L.* High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance // *Clin. Chem.* – 2008. – **54**. – P. 1608–1616.
73. *Chen R., Mias G. I., Li-Pook-Than J. et al.* Personal Omics Profiling Reveals Dynamic Molecular and Medical Phenotypes // *Cell.* – 2012. – **148(6)**. – P. 1293–1307.
74. *Li G-W., Xie X. S.* Central dogma at the single-molecule level in living cells // *Nature.* – 2011. – **475**. – P. 308–315.
75. *Bogomolov V. V., Castrucci F., Comtois J-M. et al.* International Space Station medical standards and certification for space flight participants // *Aviat. Space Environ. Med.* – 2007. – **78**. – P. 1162–1169.
76. *Jackson D., Herath A., Swinton J. et al.* Considerations for powering a clinical proteomics study: Normal variability in the human plasma proteome // *Proteomics .Clin. Appl.* – 2009. – **3**. – P. 394–407.
77. <http://www.hupo.org/>
78. <http://c-hpp.org/meeting/>
79. <http://hupo.org/research/hpp/>
80. www.fixingproteomics.org/
81. http://www.chem-agilent.com/cimg/6490_Brochure.pdf
82. http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/02%20Yeast%20Cell%20Architecture%20and%20Function.pdf
83. www.biognosys.ch
84. www.mrmbase.ch
85. http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-8912en_lo.pdf
86. www.kb18.ru
87. <http://www.icm.jhu.edu/theses/theses/yungphd.pdf>
88. <https://www.23andme.com/>

РОЛЬ МУЛЬТИДОМЕННОЙ СТРУКТУРЫ УРОКИНАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ РОСТА И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОСУДОВ

В. А. ТКАЧУК^{1,2}, О. С. ПЛЕХАНОВА¹,
И. Б. БЕЛОГЛАЗОВА¹, Е. В. ПАРФЕНОВА¹

¹ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Минздрава РФ, Москва, Россия;

²Факультет фундаментальной медицины Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова, Россия;
e-mail: plekhanova@mail.ru

Активатор плазминогена урокиназного типа, или урокиназа (uPA), представляет собой многофункциональный белок, играющий особую регуляторную роль в сосудистой стенке и обладающий способностью запускать протеолитические и сигнальные каскады. В статье суммированы полученные авторами результаты и данные литературы, касающиеся роли урокиназы в ремоделировании кровеносных сосудов и ангиогенезе. В настоящее время урокиназу можно рассматривать как перспективную мишень для воздействий, направленных на профилактику рестенозов, предотвращение негативного ремоделирования артерий, стимуляцию роста сосудов при ишемических заболеваниях и подавление ангиогенеза при онкологических заболеваниях.

В 60-е годы в связи с прогрессом в медицине особое внимание исследователей привлекли процессы фибринолиза. В 1952 году в моче были обнаружены «киназы», способные превращать плазминоген в плазмин [1]. В 1954 году удалось выделить и очистить фермент, непрерывно выделяемый с мочой, названный в связи с этим урокиназой, или урофиринолизокиназой [2, 3]. Этот фермент способен вызывать фибринолиз аналогично известной к тому времени стрептокиназе, действуя не прямо как фибринолитический фермент, а через активацию плазминогена [4]. С тех пор урокиназа непрерывно привлекала к себе внимание исследователей, и к настоящему времени опубликовано более 16 000 статей, посвященных этому ферменту. Установлено, что урокиназа представляет собой мультидоменный многофункциональный белок, превращающий плазминоген в плазмин, который помимо регуляции фибринолиза осуществляет активацию факторов роста, модуляцию цитокинов, шеддинг-рецепторов, фенотипическую трансформацию клеток, экспрессию белков и активацию протеолитических каскадов. Эти механизмы обеспечивают стимуляцию миграции и пролиферации клеток под действием урокиназы, ключевых процессов ремоделирования артерий, прогрес-

сирования атеросклероза, рестеноза после процедур реваскуляризации и ангиогенеза при ишемии тканей. Более 20 лет назад нами были начаты исследования по выяснению механизмов участия урокиназы в процессах ремоделирования сосудов и ангиогенеза. Мы надеялись, что изучение роли отдельных доменов урокиназы в различных функциях этого белка позволит нам разработать на основе модифицированных форм урокиназы лекарственные препараты, влияющие на эти процессы. Для этого были созданы рекомбинантные конструкции, позволяющие синтезировать разные формы урокиназы и ее отдельные домены (рис. 1), эффекты которых исследовались на моделях миграции и пролиферации сосудистых клеток *in vitro* и моделях ремоделирования сосудов и ангиогенеза у животных *in vivo*.

Структура урокиназы

Урокиназа синтезируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, эпителиальными клетками, фибробластами, моноцитами/макрофагами, а также клетками злокачественных опухолей различного происхождения [5–7]. В структуре урокиназы выделяют три домена – N-концевой домен, подобный эпидермальному фактору роста, крингл-домен и C-концевой каталитический домен (рис. 2). Урокиназа секретируется клетками в виде одноцепочечного полипептида с молекулярной массой 54 кДа и состоящего из 411 аминокислотных остатков [7]. Одноцепочечная урокиназа не способна проявлять пептидазную активность в отношении синтетических субстратов, но при взаимодействии с плазминогеном способна превращать его в плазмин. Плазмин, в свою очередь, является активатором урокиназы и переводит одноцепочечную урокиназу в двухцепочечную форму. Двухцепочечная урокиназа обладает протеазной активностью как по отношению к синтетическим субстратам, так и в отношении плазминогена, причем скорость расщепления плазминогена двухцепочечной урокиназой более чем в 200 раз выше, чем одноцепочечной формой [8]. В сосудистой стенке плазмин расщепляет фибрин, что способствует растворению тромба, и наряду с урокиназой активирует матриксные металлопротеиназы (ММП). ММП в свою очередь расщепляют белки внеклеточного матрикса (ВКМ) и компоненты базальной мембраны, такие как коллаген, фибронектин и ламинин [9]. Протеолитический каскад на мембране ведет к направленному движению клеток благодаря разрушению межклеточных контактов и локальному расщеплению ВКМ. Кроме того, активация и/или высвобождение латентных и связанных с матриксом факторов роста способствует также усилению хемотактического, миграционного и пролиферативного ответов сосудистых клеток.

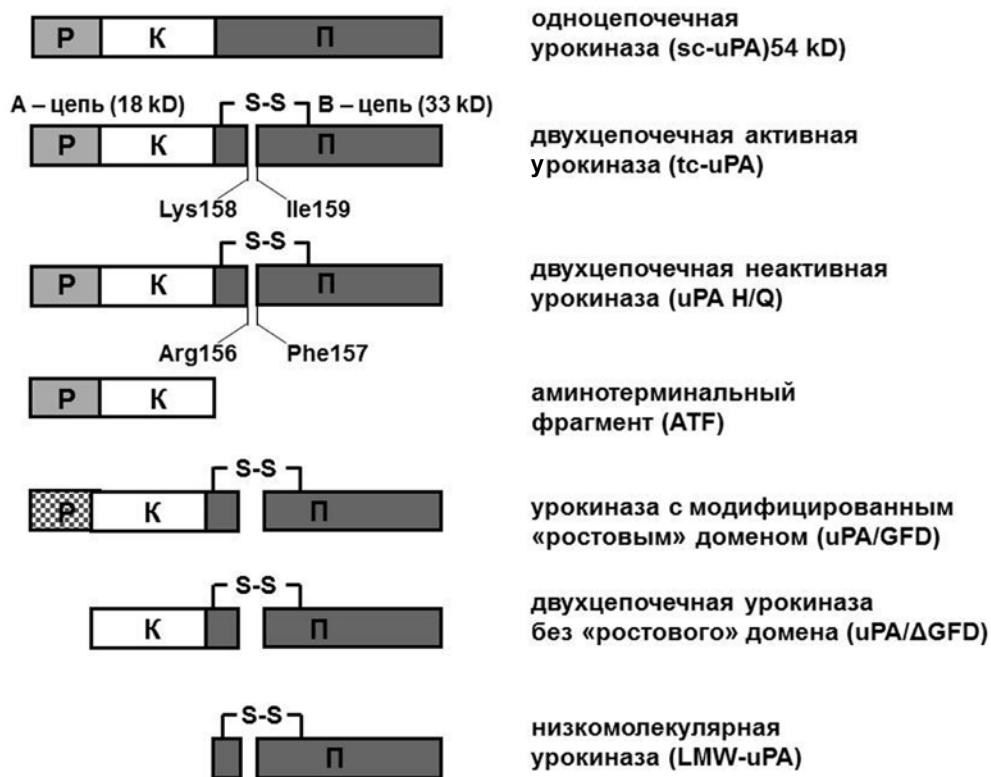


Рис. 1. Формы рекомбинантной урокиназы, полученные в ФГБУ РКНПК. Обозначения: P – домен, подобный фактору роста («ростовой» домен), K – крингл-домен, П – протеолитический домен

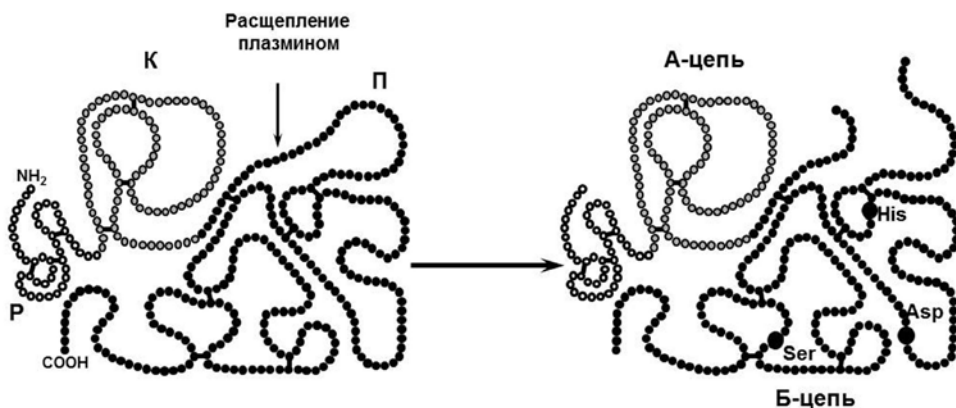


Рис. 2. Структура одноцепочечной и двухцепочечной урокиназы: P – домен, подобный фактору роста («ростовой» домен), K – крингл-домен, П – протеолитический домен

В двухцепочечной урокиназе полипептидные цепи: А (легкая) и Б (тяжелая) – соединены между собой дисульфидной связью Cys148-Cys279. А-цепь включает в себя «ростовой» домен, подобный фактору роста (growth factor like domain; GFD) и крингл-домен, а протеолитический домен входит в состав Б-цепи. По своей структуре «ростовой» домен гомологичен эпидермальному фактору роста. Похожей структурой обладают мышинный эпидермальный фактор роста mEGF и трансформирующий фактор роста α TGF- α [10]. Крингл-домен вовлечен в регуляцию миграции клеток под действием урокиназы [11], а также обеспечивает взаимодействие с гепарином через три последовательно расположенных аминокислотных остатка Arg108-Arg109-Arg110 [12]. Крингл-домен содержит участки связывания с ингибитором активаторов плазминогена PAI-1 [13] и интегринами [14, 15] Также показано, что крингл-домен принимает участие в стабилизации комплекса урокиназы с урокиназным рецептором [16]. По своей структуре он гомологичен крингл-доменам таких белков, как активатор плазминогена тканевого типа (tPA), плазминоген, протромбин, фактор XII и аполипопротеин [17]. Наибольшая гомология наблюдается со вторым крингл-доменом тканевого активатора плазминогена. Но, несмотря на это, эти домены обладают различными свойствами связывания: крингл-домен tPA взаимодействует с положительно заряженным остатком лизина у фибрина, а крингл-домен урокиназы связывается с полианионными молекулами, такими как гепарин. И это свойство выделяет крингл-домен урокиназы из всех остальных кринглов. Протеолитический домен содержит активный центр урокиназы His204/Asp255/Ser356 и осуществляет активацию плазминогена, конвертируя его в плазмин, протеазу с широкой субстратной специфичностью, а также ряда факторов роста и матриксных металлопротеиназ.

Сигнализация урокиназы

Домен, подобный фактору роста, обеспечивает высокоаффинное связывание урокиназы с ее рецептором uPAR/CD87 ($K_d \sim 10^{-10}$ – 10^{-9} М) [18,19]. Рецептор урокиназы локализуется в особых впячиваниях плазматической мембраны – кавеолах, которые содержат большое количество гликофинголипидов, сфингомиелин, полифосфоинозитиды и холестерол. Рецептор урокиназы заякорен на мембране через гликозилфосфатидилинозитол (ГФИ) и не имеет трансмембранных участков, что обеспечивает его высокой степенью подвижности в плазматической мембране [18]. Он состоит из трех доменов, гомологичных по структуре (рис. 3).

Домены рецептора формируют практически непрерывный β -слой. Все три домена собраны в правозакрученной ориентации, формируя фактически глобулярный рецептор. В центре глобулы находится центральная конусообразная полость глубиной 19 Å, которая сформирована β -складчатыми слоями трех доменов. Причем при взаимодействии с урокиназой происходит смещение третьего домена более чем на 12 Å и сближение первого и второго доменов, и взаимодействие между этими доменами осуществляется за счет контакта между His47–Asn259 и Arg53–Asp254 [20]. Ранее было показано, что в «ростовом» домене урокиназы за взаимодействие с uPAR отвечают аминокислотные остатки, расположенные с одной стороны плоскости Ω -петли Asn22, Tyr2425, Ile28, и Trp30 [21]. Недавно полученные нами результаты предполагают новый механизм связывания ростового домена урокиназы с рецептором, при котором отсутствие четкой вторичной структуры урокиназы не влияло на взаимодействие с рецептором [22]. При этом все три домена участвуют в формировании высокоаффинного участка связывания с урокиназой. Имеющиеся данные позволяют предположить, что при связывании урокиназы с высокоаффинным рецептором экспонируются участки в крингл-домене для взаимодействия с другими мишенями на поверхности клетки и запуска миграции [23]. При взаимодействии урокиназы с урокиназным рецептором происходит сближение первого и третьего домена, таким образом, происходит замыкание рецептора в кольцо и экспонирование активного участка –SRSRY– между первым и вторым доменами [24]. При этом экспонируются участки, отвечающие за сигнальные функции рецептора, а также образуются общие места связывания с белками внеклеточного матрикса и интегринами, образованные и урокиназой, и рецептором. Кроме того было показано, что рекомбинантный uPAR со сшивкой между первым и вторым доменами обладал идеинтичной константой связывания, что и нативный рецептор [25]. Таким образом, связывание урокиназы с рецептором индуцирует изменения рецепторного белка, важные для реализации ряда физиологических процессов, а рецептор, связываясь с урокиназой, изменяет ее свойства.

Связанная с рецептором одноцепочечная урокиназа активируется плазмином более эффективно, чем свободная [26]. Кроме того, в комплексе с uPAR/CD87 урокиназа медленнее подвергается отщеплению домена GFD под действием плазмина. В отличие от полно-размерного белка форма урокиназы, лишенная «ростового» домена, не только не способна взаимодействовать с uPAR/CD87, но и подвергается быстрому эндоцитозу и внутриклеточной деградаци. Та-

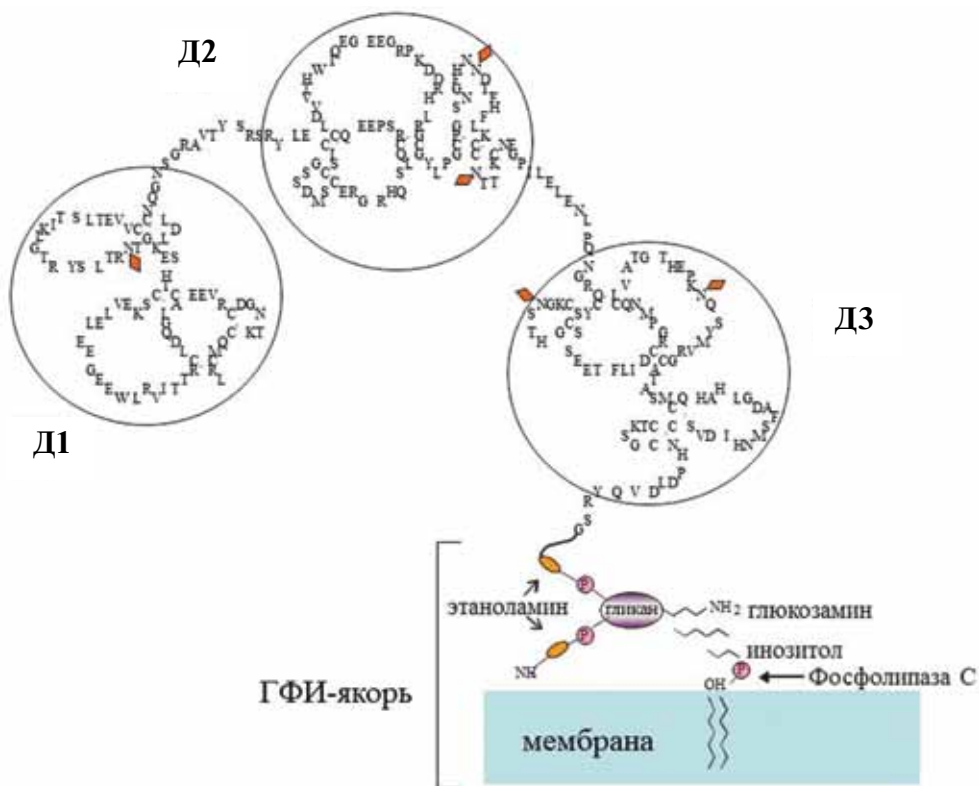


Рис. 3. Структура урокиназного рецептора. Рецептор представлен в виде последовательности аминокислотных остатков (а.о.), состоящей из трех доменов: Д1 (1–77 а.о.), Д2 (93–177 а.о.) и Д3 (193–272 а.о.). Схематично указан состав гликозилфосфатидинозитольного якоря, связывающего рецептор с плазматической мембраной

ким образом, uPAR способствует увеличению времени «полужизни» функционально активной урокиназы на поверхности клетки [27].

Для осуществления внутриклеточной сигнализации uPAR/CD87 необходимо образование комплекса рецептора с трансмембранными белками. uPAR/CD87 также может взаимодействовать с интегринами, такими как лейкоцитарный $\beta 2$ -интегрин Mac-1 (CD11b/CD18), а также $\beta 1$ -, $\beta 3$ -интегрины и с рецептором витронектина $\alpha(v)\beta 5$ [28,29]. Урокиназа модифицирует взаимодействие рецептора с интегринами [30]. Взаимодействие урокиназы с uPAR/CD87 вызывает внутриклеточную сигнализацию, которая опосредует миграцию гладкомышечных клеток (ГМК), фибробластов и других клеток, а также клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку [31]. Урокиназа

может одновременно связываться с двумя рецепторами на поверхности клетки: с uPAR/CD87 через GFD и с интегрином Мас-1 через крингл- и протеолитический домены [15]. Кроме того, крингл-домен урокиназы может связываться с другим, пока недостаточно изученным, специфическим рецептором урокиназы [11]. Крингл-домен также вовлечен в индукцию внутриклеточной сигнализации, миграции и адгезии клеток [23, 32].

A-цепь урокиназы способна взаимодействовать с рецепторами семейства липопротеинов низкой плотности (LDLR): белком, родственным рецептору липопротеинов низкой плотности/рецептор α_2 -макроглобулина (LRP/ α_2 -MR) и рецептором липопротеинов очень низкой плотности (VLDLR) [31]. Эти рецепторы обеспечивают интернализацию с поверхности клетки комплекса урокиназы с ингибитором через ямки, окаймленные клатрином. Сродство урокиназы к этим рецепторам ($K_d \sim (1-2) \cdot 10^{-8}$ М) хуже, чем сродство к рецептору uPAR/CD87 ($10^{-10}-10^{-9}$ М), в связи с этим высокоаффинное взаимодействие урокиназы с uPAR/CD87 может предотвращать связывание урокиназы с LRP/ α_2 -MR и последующую ее деградацию [34]. Эндцитоз урокиназы через LRP/ α_2 -MR или VLDLR индуцирует также внутриклеточную сигнализацию и адгезию клеток [35].

Сигнальные эффекты урокиназы могут быть опосредованы как через uPAR/CD87, LRP/ α_2 -MR, так и через другие, связывающие урокиназу, белки [36] (рис. 4). Показано, что миграция, индуцированная урокиназой, ассоциирована с активацией Src- и Janus-киназ [31]. uPAR/CD87 копреципитируется с тирозиновыми протеинкиназами Hck, Fyn, Lyn, Frg, Jak1, and Tyk2 [31, 37]. Хемотаксис, индуцируемый урокиназой, опосредован G-белками (ГТФ-связывающими белками) [37]. Связывание урокиназы с uPAR/CD87 приводит к активации киназ Hsk-, FAK-, MAP-киназ (p38, ERK1,2 (p42/44)), паксиллина, протеинкиназы С ϵ (PKC ϵ), фосфорилированию цитокератинов 8 и 18, белка p130CAS и ДНК-связывающих активаторов транскрипции STAT-1 и STAT-2 [31]. Связывание урокиназы с LRP/ α_2 -MR ведет к активации протеинкиназы А с вовлечением Gs-белков [38]. Для индукции кринглзависимой миграции под действием урокиназы необходима специфическая активация p38 MAP-киназного каскада с активацией малого ГТФ-связывающего белка Rho [39]. В клетках эндотелия урокиназа активирует MAP-киназную сигнализацию посредством связывания с uPAR/CD87 и активации протеинкиназы С [40].

uPAR/CD87 был идентифицирован в комплексе с некоторыми семействами интегринов, такими как $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ и $\beta 5$ [41–45]. Компоненты матрикса способствуют выборочной ассоциации uPAR/CD87 и

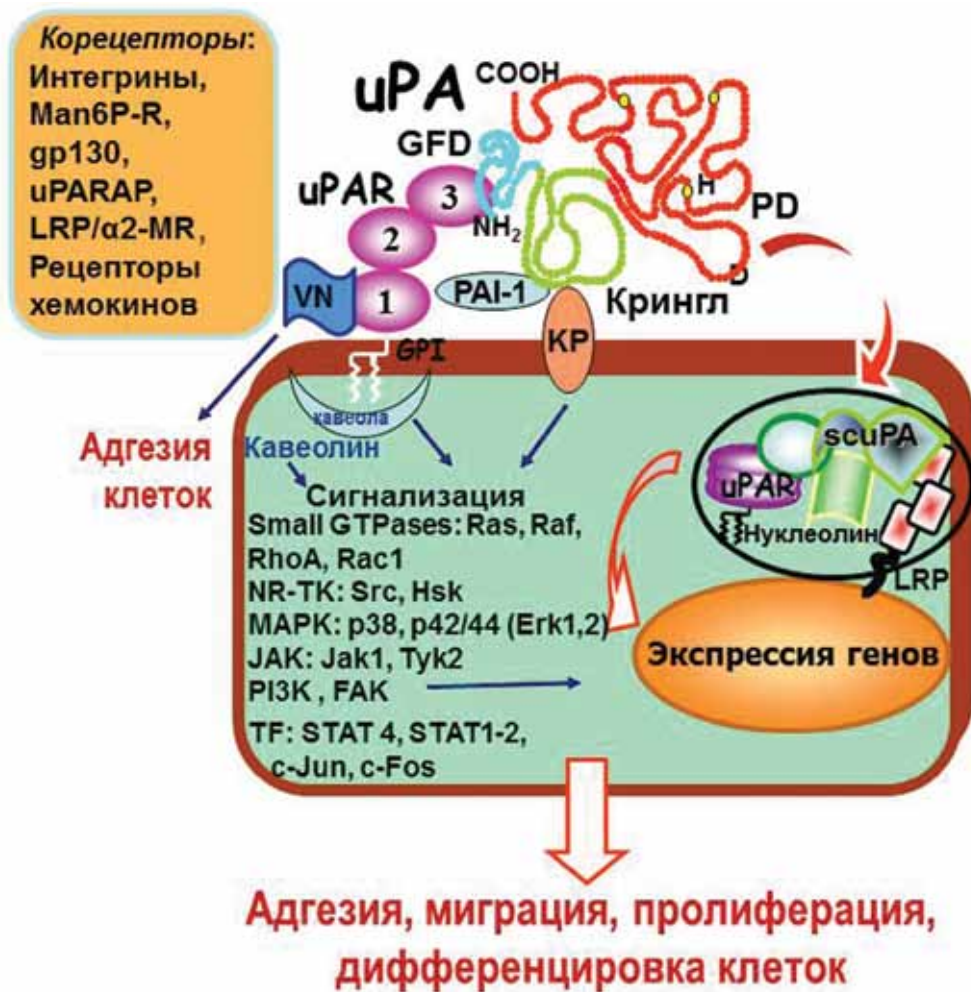


Рис. 4. Взаимодействие урокиназы с рецептором (uPAR/CD87) и крингл-связывающим белком (KP) индуцирует внутриклеточные сигнальные каскады, ведущие к адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировке клеток. GFD – домен, подобный фактору роста; PD – протеолитический домен; GPI – гликозилфосфатидилинозитольный якорь; VN – витронектин; PAI-1 – ингибитор активаторов плазминогена; scuPA – одноцепочечная урокиназа; LRP – рецептор липопротеинов низкой плотности; LRP/ α ₂-MR – белок, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности/рецептор α 2-макроглобулина; MAPK – mitogen-activated protein kinases; JAK – tyrosine protein kinases; STAT – ДНК-связывающие активаторы транскрипции; TF – факторы транскрипции; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; FAK – киназа фокальных контактов; NR-TK – нерцепторная тирозинкиназа; Man6P-R – манноза-6-фосфат/рецептор инсулиноподобного фактора роста II; gp130 – сигнальный посредник интерлейкина 6; uPARAP – белок, ассоциированный с урокиназным рецептором

интегринов. Так, uPAR- и $\beta 3$ -интегрины способны образовывать комплексы только на витронектине, но не на таких субстратах, как фибронектин, ламинин или полилизин. Интегрин $\alpha 5$ колокализировался с uPAR на фибронектине, $\alpha 5$ и αv – на витронектине, а $\alpha 3$ и $\beta 6$ – на ламинине [44]. uPAR/CD87, связываясь с $\beta 1$ -интегринами, блокирует их адгезивные функции, но, в то же время, через собственные участки связывания с витронектином стимулирует клеточную адгезию на витронектине. uPAR-зависимая адгезия на витронектине коррелирует с формированием мембранного комплекса, включающего интегрин $\beta 1$, кавеолин и uPAR [43]. Также $\beta 1$ - и витронектинзависимым образом урокиназа стимулирует миграцию клеток рака груди MCF-7 [46]. Одним из основных партнеров комплекса uPA-uPAR является $\alpha_3\beta_1$ -интегрин. Показано, что урокиназа стимулирует формирование комплекса uPAR- $\alpha_3\beta_1$ на клетках MDA-MB-231, что сопровождается распластыванием клеток и фосфорилированием ФАК (белок фокальной адгезии) на таких субстратах, как фибронектин и коллаген 1-го типа [47]. Образование комплекса между $\alpha_3\beta_1$ и uPAR в эпителиальных клетках приводит к активации Src-киназ и значительному снижению экспрессии E-кадгерина с последующим разрушением межклеточных контактов [48]. Также было показано, что рецептор урокиназы может связываться с рядом интегринов на соседней клетке – $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ и $\alpha 9\beta 1$, способствуя тем самым межклеточному взаимодействию и адгезии. Ассоциация uPAR с $\alpha 5\beta 1$ интегрином в клетках карциномы HEP-3, экспрессирующих высокий уровень uPAR, обеспечивает клеточную адгезию на фибронектин, сопровождаемую активацией ERK1/2. Ассоциация uPAR с $\alpha 5\beta 1$ индуцирует в интегрине появление дополнительного сайта для фибронектина в дополнение к связывающему RGD-сайту. Недавно на uPAR был идентифицирован сайт связывания с $\alpha 5\beta 1$ во втором домене (130–142 а.о.) Тем не менее для связывания с интегрином необходимы все три домена рецептора как в случае витронектина и урокиназы [49].

Показано функциональное взаимодействие uPAR с $\beta 2$ -интегринами, например, рецептором компонента 34-го типа (CR3, CD11 β /CD18, Mac-1) [44]. uPAR/CD87, Mac-1 и Src-киназы (p60^{lyn}, p53/56^{lyn}, p58/64^{hck}, p59^{fgf}) образуют единый рецепторный комплекс на поверхности моноцитов [50]. Взаимодействие uPAR с Mac-1 ингибирует способность интегрин связываться со своим лигандом, фибриногеном, из-за близкого расположения участков связывания фибриногена (I домен) и uPAR [51]. Трехмолекулярный комплекс uPA – uPAR – Mac-1 регулирует клеточную адгезию, миграцию и фибринолиз и усиливает опосредованную урокиназой активацию плазминогена. Белковый ингибитор урокиназы PAI-1 связывается и

инактивирует uPA–uPAR комплексы. Это не только ограничивает протеолиз, но и освобождает Мас-1 от ингибирования, опосредованного uPA–uPAR. PAI-1 может также полностью блокировать как uPAR-, так и α v-интегринопосредованное связывание витронектина, указывая тем самым, что все три рецептора могут связывать витронектин сходным образом. В сосудистых ГМК происходит зависимое от урокиназы и ее рецептора фосфорилирование витронектина кэзеинкиназой-2, ведущее к улучшению его связывания с интегринами и uPAR/CD87 [52]. Недавно был обнаружен мембранный белок, ассоциированный с uPAR (uPARAP или Endo180), который принимает участие в интернализации коллагена для его внутриклеточной деградации. Комплекс uPAR с uPARAP играет ключевую роль в деградации матрикса [53].

Недавно мы выявили новый сигнальный путь урокиназы, зависимый от ее крингл-домена и ассоциированный с ее быстрой транслокацией в ядро с помощью нуклеолина, что позволяет урокиназе участвовать в регуляции транскрипции генов [32]. С помощью клеточной визуализации урокиназы методом флуоресцентной микроскопии в клетках HeLa мы показали существование ядерной транслокации урокиназы (рис. 5). Как видно на рис. 5, транслокация урокиназы в ядро не зависит от присутствия ростового домена урокиназы. В то же время наличие в молекуле урокиназы крингл-домена оказалось обязательным для ее ядерной транслокации. Урокиназа, проникнув в ядро, вызывает экспрессию гладкомышечного α -актина. При повреждении зависимое от урокиназы превращение фибробластоподобных клеток в миобласты, клетки мигрируют, пролиферируют, что важно при развитии констриктивного ремоделирования сосудов.

Роль междоменных взаимодействий в молекуле урокиназы в стимуляции миграции клеток

Крингл-домен вовлечен в регуляцию миграции клеток под действием урокиназы [11] и принимает участие в стабилизации комплекса урокиназы с урокиназным рецептором [16, 54]. Данные, полученные в нашей лаборатории, свидетельствуют о том, что крингл-домен урокиназы, а также форма, лишенная ростового домена, которая не связывается с «классическим» урокиназным рецептором, способны вызывать активацию p38- и p42/44-МАР-киназ и миграцию клеток. Показано, что на поверхности ГМК крингл-домен связывается с белком, который отличается от урокиназного рецептора и интегринов [11]. В этом случае активация миграции под действием крингл-домена может происходить и без участия урокиназного ре-

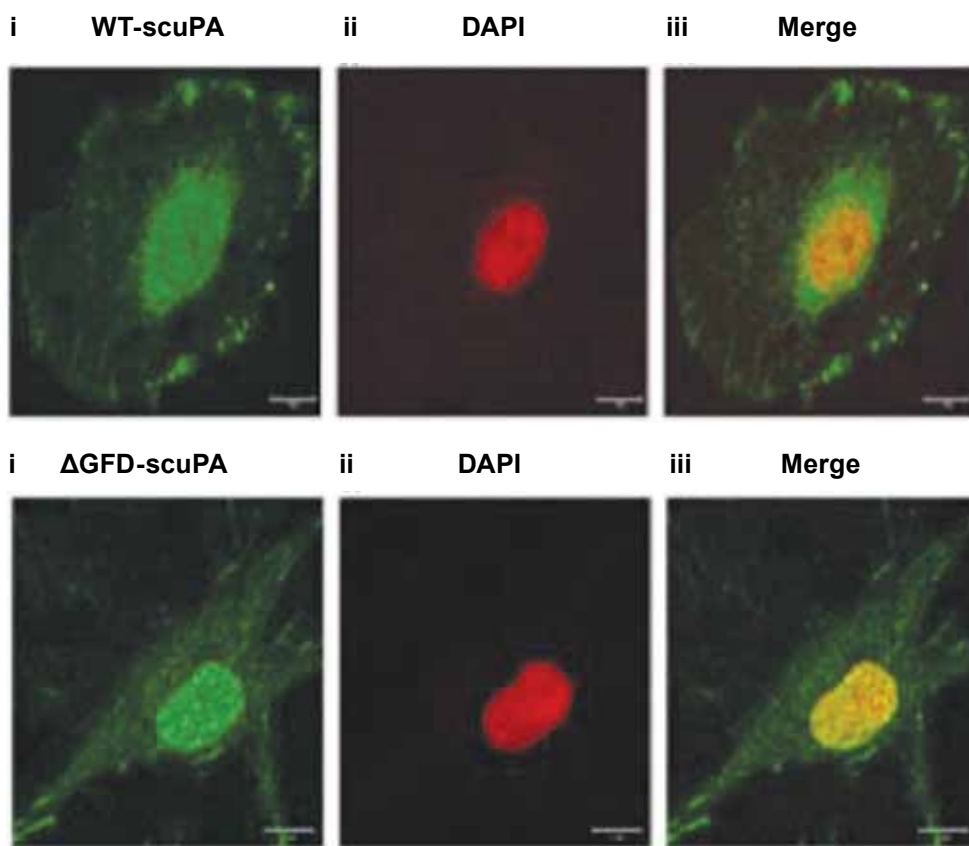


Рис. 5. Транслокация урокиназы в клеточное ядро. Клетки *HeLa* инкубировали 30 мин в присутствии 10нМ нативной урокиназы (*WT-scuPA*, верхний ряд) или урокиназы без ростового домена (Δ *GFD-scuPA*, нижний ряд), затем визуализировали с помощью антител к урокиназе или ядерного красителя *DAPI*. *Merge* – наложение изображений, полученных при визуализации с помощью антител к урокиназе или *DAPI*

цептора. Нами было показано [11], что форма урокиназы, лишенная крингл-домена, не обладает хемотаксическими свойствами, несмотря на способность связываться с урокиназным рецептором. При сравнении хемотаксических свойств различных форм урокиназы мы выяснили, что нативная урокиназа и урокиназа без ростового домена проявляют хемотаксическую активность, взаимодействуя или только с кринглсвязывающим белком, или с урокиназным рецептором и кринглсвязывающим белком.

Проведенные нами структурные исследования указали на потенциальную возможность существования внутримолекулярных

взаимодействий между крингл-доменом и ростовым доменом урокиназы, которые влияют на ее хемотаксические свойства. Мы обнаружили, что крингл домен способен конкурировать с рецептором за связывание с иммобилизованной нативной урокиназой, а именно с ее ростовым доменом. Урокиназа с модифицированным ростовым доменом не только не связывалась с клетками, но и не активировала миграцию [55, 56]. С использованием этой формы мы показали, что крингл-домен в составе модифицированной урокиназы взаимодействует с модифицированным ростовым доменом внутри одной и той же молекулы, что не позволяет кринглу связываться с ростовым доменом иммобилизованной нативной урокиназы. Наши данные позволили предположить, что ростовой и крингл-домены могут взаимодействовать между собой как в составе одной молекулы, так и в составе разных молекул, если внутримолекулярные взаимодействия разобщены под влиянием связывания с другими белками. Также можно предположить, что ростовой домен экранирует крингл в молекуле урокиназы и «не позволяет» последнему связаться со своим рецептором до тех пор, пока ростовой домен не свяжется с рецептором урокиназы. Взаимодействие урокиназного рецептора с ростовым доменом урокиназы вызывает экспонирование крингл-домена и позволяет ему взаимодействовать с дополнительными мишенями клеточной мембраны («кринглсвязывающим белком» и интегринами) [23]. Показано также, что взаимодействие урокиназы с ее «классическим» рецептором (uPAR) вызывает «пермиссивный» эффект для взаимодействия крингл-домена с другими мишенями на поверхности клетки. На основе наших данных можно предположить, что «классический» рецептор урокиназы служит «адаптором» для урокиназы, а при связывании крингл-домена урокиназы со своим рецептором происходит непосредственная активация внутриклеточной сигнализации и стимуляция миграции клеток.

Недавно мы показали существование на клетках *дополнительных участков связывания для урокиназы*, один из которых взаимодействует с урокиназой через ее протеолитический домен [27], тогда как другой проявлял способность связывать крингл-домен. Взаимодействие со вторым участком не зависело от присутствия в структуре урокиназы «ростового» домена и приводило к стимуляции урокиназой миграции клеток [11]. Также было установлено, что на поверхности клеток может происходить образование формы урокиназы, лишенной ростового домена, которая не способна связываться с uPAR. Урокиназа без ростового домена подвергалась при этом быстрому LRP-зависимому эндоцитозу и внутриклеточной деградации [27]. Поскольку было показано, что LRP опосредует активацию миграции и пролиферации

клеток, а также вовлечен в регуляцию проницаемости сосудистой стенки [57], мы предположили, что новая мишень, совместно с LRP, может обеспечивать связывание урокиназы без «ростового» домена с поверхностью клеток, а также принимать участие в регуляции ее ферментативной и хемотактической активности. Нами была обнаружена новая мишень связывания урокиназы на поверхности клеток, отличная от uPAR/CD87, – фибулин-5 [58]. Удалось установить, что урокиназа способна непосредственно взаимодействовать с фибулином-5 через протеолитический домен.

Анализ связывания мутантных форм фибулина-5 с иммобилизованной формой урокиназы показал, что урокиназа связывается с формами фибулина-5, содержащими С-глобулярный домен, и не связывается с фибулином-5, лишенным С-глобулярного домена. Таким образом, участок связывания с урокиназой находится в С-глобулярном домене фибулина-5 (аминокислотные остатки 320–448). Фибулин-5 содержит в своей структуре 5 кальцийсвязывающих повторов, гомологичных эпидермальному фактору роста. Мы выяснили, что нативная структура кальцийсвязывающих доменов необходима для связывания фибулина-5 и урокиназы. Хотя урокиназа связывает фибулин-5 через протеолитический домен, фибулин-5 не является ее субстратом и не оказывает влияния на амидолитическую активность урокиназы. При этом фибулин-5 ингибирует реакцию активации плазминогена одноцепочечной урокиназой. Мы показали, что в клетках линии MEF, а также лизатах тканей легкого мышей, лишенных гена фибулина-5, удаление гена фибулина-5 приводит к снижению активности урокиназы как в лизатах клеток линии MEF, так и лизатах легкого мыши. Однако фибулин-5 увеличивает активность урокиназы *in vivo*, не влияя на уровень ее экспрессии. Оказалось, что фибулин-5, связываясь с протеолитическим доменом, защищает uPA от подавления ее активности под действием физиологического ингибитора PAI-1. PAI-1 образует эквимольный ковалентный комплекс с активным центром uPA, полностью ингибируя ее активность. Формирование данного комплекса приводит к быстрому эндоцитозу комплекса uPA–uPAR с клеточной поверхности и деградации uPA. В отсутствие фибулина-5 происходит перераспределение содержания урокиназы в ее комплексе с ингибитором PAI-1. Таким образом, высокоаффинное связывание одноцепочечной урокиназы с интегринсвязывающим белком внеклеточного матрикса фибулином-5 концентрирует ее в связанном с матриксом виде, препятствуя ее активации плазмином. Полученные данные позволяют предположить, что на лидирующем крае мигрирующей клетки формируется комплекс, включающий урокиназу и фибулин-5, а также

uPAR, латерально ассоциированный с интегринами. При увеличении экспрессии фибулина-5 подвижность клеток существенно снижается и наблюдается ингибирование хемотактических свойств урокиназы. Ранее было показано, что в стромальных клетках мышцы фибулин-5 ингибировал зависимую от $\beta 1$ -интегрина и фибронектина гиперэкспрессию ММП-9 [59]. Кроме того, известно, что фибулин-5 в сосудистой стенке связан с тропоэластином, который взаимодействует с интегринами и локализуется на эластических волокнах [60]. Отсутствие фибулина-5 у трансгенных мышей приводило к нарушению эластичности сосудистой стенки, что может иметь значение при remodelировании сосудов, однако эти аспекты требуют дальнейшего изучения. Получены противоречивые данные, касающиеся влияния фибулина на ангиогенез. Так, у животных, лишенных гена фибулина, отмечались подавление опухолевого ангиогенеза и повышенное образование активных форм кислорода [61], в тоже время было показано *in vitro* и *in vivo*; что фибулин-5 может блокировать ангиогенез, индуцируя антиангиогенный тромбоспондин-1 и препятствуя сигнализации VEGF(165) и $\alpha 5\beta 1$ -интегриновый рецептор фибронектина [62]. В то же время известно, что при связывании урокиназы с ее рецептором происходит взаимодействие uPAR с $\alpha 5\beta 1$ -интегрином, ведущее к сигнализации и стимуляции адгезии и миграции клеток [63]. В связи с вышеизложенным обнаруженный нами механизм может иметь значение для регуляции процессов ангиогенеза и remodelирования сосудов.

Важными представляются полученные недавно данные о том, что крингл-домен урокиназы может напрямую связываться с $\alpha 5\beta 3$ -интегринами и вызывать внутриклеточную сигнализацию, активацию и адгезию нейтрофилов [14, 64]. Эти данные говорят о том, что крингл-домен урокиназы вовлечен в реализацию ее провоспалительных эффектов, что необходимо учитывать при создании препаратов, ингибирующих эффекты урокиназы. Кроме того, тот факт, что крингл-домен урокиназы способен связываться с интегринами, привел некоторых исследователей к заключению, что, вероятно, на поверхности клетки при взаимодействии урокиназы с ее классическим рецептором uPAR интегрин взаимодействуют одновременно с крингл-доменом урокиназы и с ее рецептором uPAR, вместе этот комплекс и вызывает внутриклеточную сигнализацию [65].

Протеолитический каскад, индуцируемый урокиназой

Одной из основных функций урокиназы является протеолитическая активация плазминогена в плазмин при расщеплении оди-
ночной пептидной связи в плазминогене (Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶²). Плазмин

является внеклеточной протеиназой с широкой субстратной специфичностью и обладает фибринолитическими свойствами. Тканевой активатор плазминогена является основным для осуществления фибринолитической функции и регуляции гемостаза, тогда как урокиназа играет роль в активации плазминогена на поверхности клеток. Эффективность активации плазминогена урокиназой, главным образом, зависит от ее связывания с uPAR на поверхности клеток [66]. Проурокиназа, связанная с поверхностью клеток, встречается с плазмином, локализованным на клеточной поверхности [67], после чего проурокиназа активируется плазмином [26], и положительная обратная связь замыкается, так как и плазмин, и двухцепочечная урокиназа могут взаимно активировать неактивные формы друг друга. Связывание урокиназы с рецептором сопровождается снижением его латеральной подвижности и локализацией рецептора преимущественно на участках межклеточных контактов, тем самым локализуя протеолитическую активность, опосредованную урокиназой, на лидирующем крае мигрирующей клетки [68].

Помимо фибринолиза плазмин также участвует в расщеплении белков внеклеточного матрикса и базальной мембраны, таких как фибриноген, ламинин, коллаген. Кроме того, плазмин опосредует активацию матриксных металлопротеиназ, в том числе коллагеназы (ММП-1), стромелизина (ММП-3) и желатиназы В (ММП-9) [69]. Путем образования плазмина урокиназа обеспечивает расщепление основных компонентов внеклеточного матрикса, ослабление межклеточных контактов и повышение внутритканевой подвижности клеток, принимая участие в регуляции ангиогенеза, ремоделирования сосудов, роста и метастазирования раковых опухолей.

Мы обнаружили, что урокиназа стимулирует образование и высвобождение 92 kDa матриксной металлопротеиназы ММП-9/желатиназы В в моноцитах линий ТНР-1 и U937 [70, 71]. Экспрессия ММП-9 в клетках ТНР-1 под действием урокиназы не зависит от образования плазмина, и не воспроизводится при действии на клетки тканевого активатора плазминогена. Каталитическая активность урокиназы не является обязательным условием для экспрессии ММП-9 клетками ТНР-1, обработанных урокиназой, и, по-видимому, другие домены урокиназы также вовлечены в этот процесс.

Для оценки роли структурных доменов uPA в экспрессии ММП-9 в моноцитах, мы измеряли высвобождение ММП-9 ТНР-1 клетками, которые были стимулированы рекомбинантными формами урокиназы: «дикий тип» uPA (r-uPAwt) с неизменной первичной структурой; r-uPAH/Q без каталитической активности в результате замены His204 на Gln204 в активном центре; r-uPA-GFD без ро-

стового домена; г-uPAH/Q-GFD без ростового домена с заменой в активном центре; г-uPA-KD без крингл-домена; LMW-uPA, низкомолекулярная форма uPA, каталитически активная, но без ростового и крингл-доменов; и г-KD, содежащий только крингл-домен.

По сравнению с остальными конструктами, «дикий тип» uPA обладает наибольшей способностью индуцировать высвобождение ММП-9 клетками ТНР-1. Вызывать экспрессию ММП-9 также способны г-uPAH/Q, г-uPA-GFD, г-uPAH/Q-GFD и г-uPA-KD, но степень эффекта в этом случае ниже, чем в присутствии г-uPA (на 40–80% в том случае, когда 20 нМ белков было добавлено к ТНР-1 клеткам). LMW-uPA и г-KD не обладают способностью вызывать высвобождение ММП-9 клетками ТНР-1.

Наши данные свидетельствуют о том, что урокиназа способна индуцировать образование матриксной металлопротеиназы-9 в моноцитах, и этот эффект опосредуется активацией MAP-киназного сигнального пути MEK1/ERK1,2, а также происходит при участии арахидоновой кислоты, образующейся в результате реакции, катализируемой цитозольной формой фосфолипазы A2 [72]. Конечной точкой приложения этого пути может являться активация транскрипционного фактора NFκB, активирующего работу гена ММП-9, а также, возможно, ряда других провоспалительных генов. На основании этих данных можно полагать, что фактор некроза опухолей также является промежуточным звеном процесса передачи внутриклеточного сигнала, вызывающего образование ММП-9. Об этом свидетельствуют полученные нами данные, указывающие на возможность подавления способности урокиназы к образованию матриксной металлопротеиназы-9 в присутствии препарата etanercept, блокирующего взаимодействие фактора некроза опухолей с его клеточными рецепторами. В целом процесс образования ММП-9 под действием урокиназы достаточно сложен и включает в себя как стимуляцию компонентов клеточного сигналинга, так и образование промежуточных факторов, в частности фактора некроза опухолей, являющегося мощным провоспалительным агентом.

В нашем недавнем исследовании было обнаружено, что урокиназа стимулирует экспрессию ММП-9 и образование АФК в культивируемых фибробластах (статья направлена в печать). Антиоксидант эбселен нивелирует стимулирующее влияние урокиназы на экспрессию ММП-9 в фибробластах. Сходным, но более выраженным действием обладал фактор некроза опухолей альфа. Полученные данные свидетельствуют о том, что урокиназа может регулировать экспрессию ММП-9 за счет образования АФК в фибробластах, что может играть важную роль в стимуляции миграции фибробластов и развитии кон-

стриктивного (негативного) ремоделирования сосудов за счет утолщения адвентиции.

Урокиназа также принимает участие в активации и высвобождении ряда факторов роста, связанных с межклеточным матриксом. Так, было показано участие урокиназы в активации фактора роста гепатоцитов (HGF), который секретируется стромальными фибробластами в виде одноцепочечного биологически неактивного предшественника [73]. Кроме того, урокиназа принимает участие в активации VEGF-189 [74] и плазминзависимым образом в активации TGF- β [75] и Cugb1 [76].

Адгезия и миграция

Было показано, что урокиназа способна стимулировать миграцию эндотелиальных [77], гладкомышечных [78], эпителиальных клеток [79] и моноцитов [80] независимо от ее протеолитической активности. Существует несколько моделей участия урокиназы в запуске клеточной миграции. uPAR играет важную роль в образовании кластеров интегринов и сигнальных молекул, что необходимо для эффективной передачи сигнала от интегриновых рецепторов [51].

Нами было установлено, что крингл-домен урокиназы опосредует ее хемотаксические эффекты на гладкомышечных клетках [11]. Так, крингл-домен урокиназы, а также форма, лишенная ростового домена, которая не связывается с «классическим» рецептором uPAR/CD87, способны вызывать активацию p38 и p42/44 MAP-киназ и миграцию клеток. В серии работ показана активация серин-треониновых киназ, таких как киназы ERK/MAPK под действием урокиназы [37, 50, 80]. При ингибировании данного пути, урокиназа или ее крингл-домен, не способны активировать миграцию [39]. Показано, что на поверхности ГМК крингл-домен связывается с белком, который отличается от uPAR и интегринов, и активация миграции под действием крингл-домена может происходить и без участия uPAR [11]. Более того, форма урокиназы, лишенная крингл-домена, не обладает хемотаксическими свойствами несмотря на способность связываться с uPAR [11]. Тем не менее, в случае активации миграции под действием полноразмерной урокиназы, в структуре которой присутствуют как ростовой, так и крингл-домены, оказалось необходимым связывание обоих доменов со своими рецепторами – uPAR и «кринглсвязывающим белком» (КСБ).

Процесс клеточной миграции можно разбить на несколько этапов:

1) Связывание урокиназы с uPAR на гладкомышечных и эндотелиальных клетках приводит к активации Jak/Stat-сигнального пути.

Janus киназы, Jak1 и Tyk2, образуют комплекс с uPA-uPAR на лидирующем крае клетки, что, в свою очередь, приводит к транслокации факторов Stat1, Stat2 и Stat4 в ядро клетки [52]. Миграционный ответ опосредуется Tyk2/PI3-K/RhoA/Rho киназным путем.

2) Последующие сигнальные пути требуют ассоциации uPAR с PDGFR-b и зависят от его киназной активности и взаимодействия с PI3-K через Tyr740/Tyr751.

3) Далее, активация STAT1 урокиназой также требует ассоциации рецепторов и PDGFR-киназной активности, однако не зависит от PI3-K.

Методом соиммунопреципитации было показано, что при взаимодействии урокиназы с uPAR в ГМК происходит их ассоциация с PDGFR-b, после чего происходит его активация и димеризация. Причем для этого процесса не требовался протеолитический домен урокиназы [81]. PDGFR-b способен взаимодействовать с STAT1 и непосредственно его фосфорилирует. Авторы предполагают главную роль STAT1 в регуляции клеточной пролиферации и в повышении времени миграции ГМК на урокиназу путем замедления клеточного цикла (рис. 6).

Также было показано, что активация ERK может быть опосредована образованием комплекса uPAR с EGFR [82]. Rostocil и соавторы показали, что крингл-домен урокиназы запускает клеточную миграцию через Gαi, сопряженный с G-белком PI3-K зависимый процесс, в котором участвует EGFR и включает в себя ERK1/2 и p38MAPK [83]. Причем миграция, вызванная крингл-доменом, оказалась плазминзависимой и MMP-зависимой, то есть при связывании урокиназы с uPAR клетка с помощью направленного протеолиза расчищает себе путь, а крингл-домен урокиназы запускает внутриклеточный сигналинг, который способствует непосредственно движению клетки.

На линии опухолевых клеток MCF-7 было показано, что uPAR и β1-интегрины участвуют в миграции, стимулированной урокиназой, посредством активации сигнального каскада с участием Ras, MEK, ERK и MLCK [46]. Также было показано, что образование комплекса uPAR – фибронектин-интегриновый рецептор фибронектина αβ1 приводит к повышению уровня активации ERK [84].

Методом соиммунопреципитации было показано связывание uPAR с нерецепторными Src тирозиновыми киназами: p59^{fyn}, p53/56^{lyn}, p53/59^{hsk}, p55^{fgf} [85], p60^{fyn}, p53/p56^{lyn}, p56&p59^{hck}, p59^{fgf} [50].

На почечных эндотелиальных клетках линии TCL было установлено, что кластеризация uPAR и урокиназа с помощью моноклональных антител способствовала ассоциации киназы JAK1 с uPAR, вследствие чего происходило фосфорилирование и димеризация Stat1

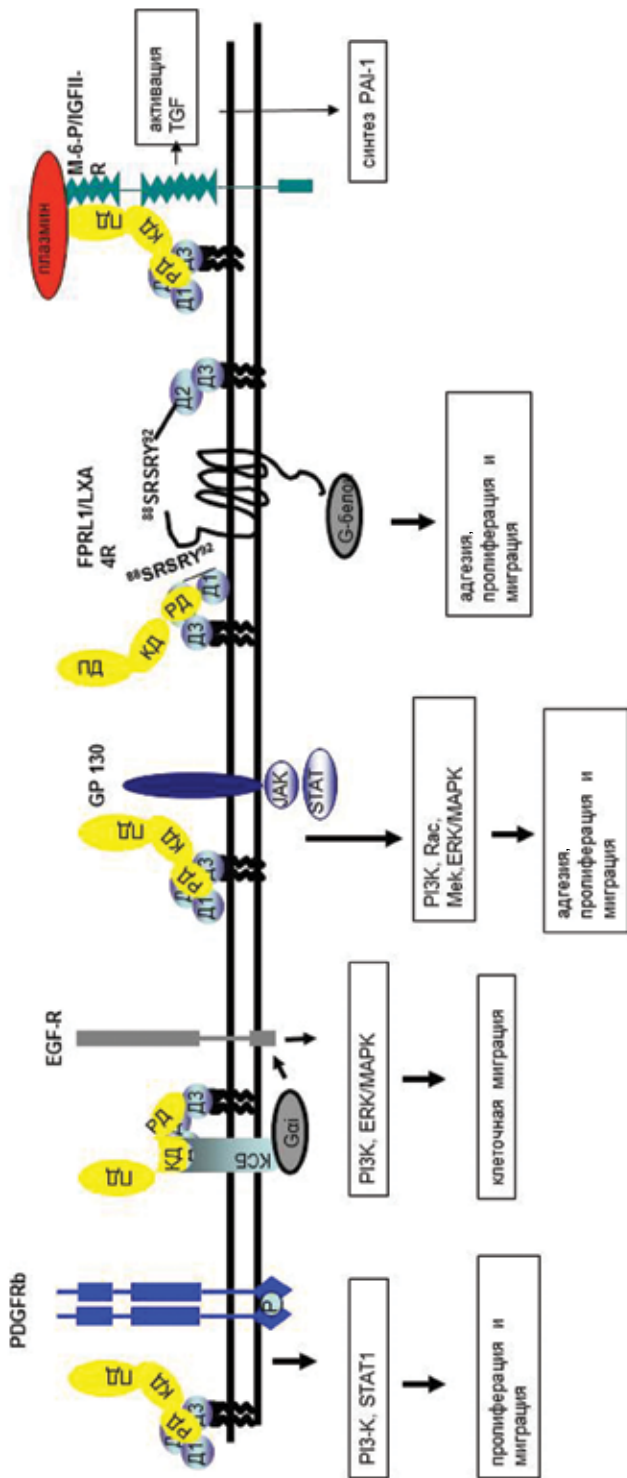


Рис. 6. Некоторые важные взаимодействия урелиназы и ее рецептора, ведущие к адгезии, миграции и пролиферации клеток

и индуцировалась ядерная транслокация, приводящая к его связыванию со специфическими сайтами на ДНК GAS (сайт активации интерферон- γ) и ISRE (интерферонстимулированный элемент ответа). Более вероятно, что сигнал внутрь клетки опосредует белок gp130, который также солюбилизовался с uPAR [86]. Интерлейкин-6-рецептор- β (gp130) является цитокиновым рецептором, который связывает цитокины, например IL-6, и принимает участие в активации Src-киназ и Jak/Stat сигнального пути. Белок gp130 также может ассоциироваться с uPAR и активировать JAK/STAT-путь [85,86], что позволяет предположить его роль в качестве трансмембранного адаптера, служащего для передачи сигнала от урокиназы внутрь клетки.

Рецептор урокиназы, взаимодействуя с интегринами, влияет не только на клеточные функции, но и на адгезионнозависимую внутриклеточную сигнализацию. При блокировании этого взаимодействия происходит блокировка ассоциации семейства Src-киназ с β -интегринами. Было показано, что uPAR стабилизирует кавеолин – интегриновый комплекс, в то время как члены семейства Src соединяются с β -цепью интегринина через кавеолин-1. Взаимодействие src с интегрининами необходимо для запуска адгезионнозависимой клеточной миграции. Для клеточной миграции необходим целый набор белков, осуществляющих физическую связь между внеклеточным матриксом и цитоскелетом. В таких фокальных контактах содержатся интегринины – рецепторы ВКМ, а цепи актина прикреплены к цитоплазматической стороне с помощью винкулина, паксиллина и талина [87]. Мигрирующая клетка разрушает контакты с ВКМ и перестраивает их на мигрирующий край клетки [88].

На линиях раковых клеток была показана функциональная ассоциация uPAR с Src и FAK (киназы фокальных контактов) и то, что Src и FAK совместно участвуют в запуске внутриклеточной сигнализации для клеточной миграции [89].

Известен еще один механизм влияния урокиназы на миграцию клетки, заключающийся в сближении доменов 1-го и 3-го рецептора при взаимодействии uPA с uPAR. При этой структурной перестройке рецептора происходит высвобождение последовательности SRSRY между 1- и 2-ым доменами, которая стимулирует миграцию моноцитов, фибробластов и ГМК. Если во время взаимодействия урокиназы и uPAR не происходит ингибирования протеолитического домена урокиназы, она способна «раскусывать» участок между первым и вторым доменом uPAR, тем самым, высвобождая SRSRY. Было показано, что FPRL1 (гомолог fMLP-рецептора) опосредует клеточную миграцию, вызванную экспонированием SRSRY [80]. Также было показано, что при стимуляции клеток этим пептидом происходит активация p56/p59hck тирозиновой киназы через G-белки [90].

Kjøller и соавторы показали, что uPAR, взаимодействуя с витронектином, инициирует p130Cas/Rac-зависимый сигнальный путь, приводящий к реорганизации актина и повышению клеточной подвижности, и в то же время служит в качестве адгезионного рецептора, необходимого для этих процессов [91].

Эндоцитоз

Установлено, что интернализация урокиназы, а также других лигандов через рецепторы, подобные рецептору LDL, сопровождается активацией сигнальных систем клетки, приводящей к активации внутриклеточных протеинкиназ. Через последовательности Asp-Pro-X-Tyr рецепторы, родственные рецептору LDL, взаимодействуют с цитоплазматическим адаптерным белком Dab-1, что приводит к связыванию и регулированию активации нерепторных тирозиновых киназ семейств Src и Abl [92], а также белка tau, стабилизирующего микротрубочки [104]. Члены семейства LDLR также принимают участие в активации MAPK-зависимого сигнального пути и влияют на адгезию клеток [35]. Кроме того, было показано, что LRP/ α_2 -MR ассоциирован с гетеротримерными G-белками и принимает участие в активации PKA [38]. Интернализация урокиназы, а также других лигандов через LRP сопровождается активацией сигнальных систем, например, происходит активация протеинкиназы A. Также было показано LRP-зависимое влияние uPAR на уровень активации Rac1 в клетках мышинных эмбриональных фибробластов [93]. Интересно также отметить, что после интернализации комплекса uPA-uPAR-PAI-1 с помощью LRP и его деградации в лизосомах uPAR рециркулирует на клеточную поверхность, причем преимущественно в новообразующиеся фокальные контакты на лидирующем конце клетки [94]. Для миграции клетки необходим процесс эндоцитоза комплекса урокиназа-uPAR-PAI-1 с дальнейшим перераспределением рецептора на лидирующий край клетки. Также была показана одновременная интернализация урокиназного рецептора и интегрина бета-1 [95].

На рис. 7 представлено схематическое изображение одного из возможных вариантов событий в клетке, происходящих при клеточной миграции, вызванной урокиназой.

Пролиферация и апоптоз

Митогенная активность урокиназы наблюдалась на многих типах клеток, в том числе на человеческих эпидермальных клетках, нормальных и злокачественных клетках почки и клетках меланомы [96, 97]. Недавние исследования показали, что пролиферация раковых клеток человека зависит от взаимодействия комплекса uPA-uPAR

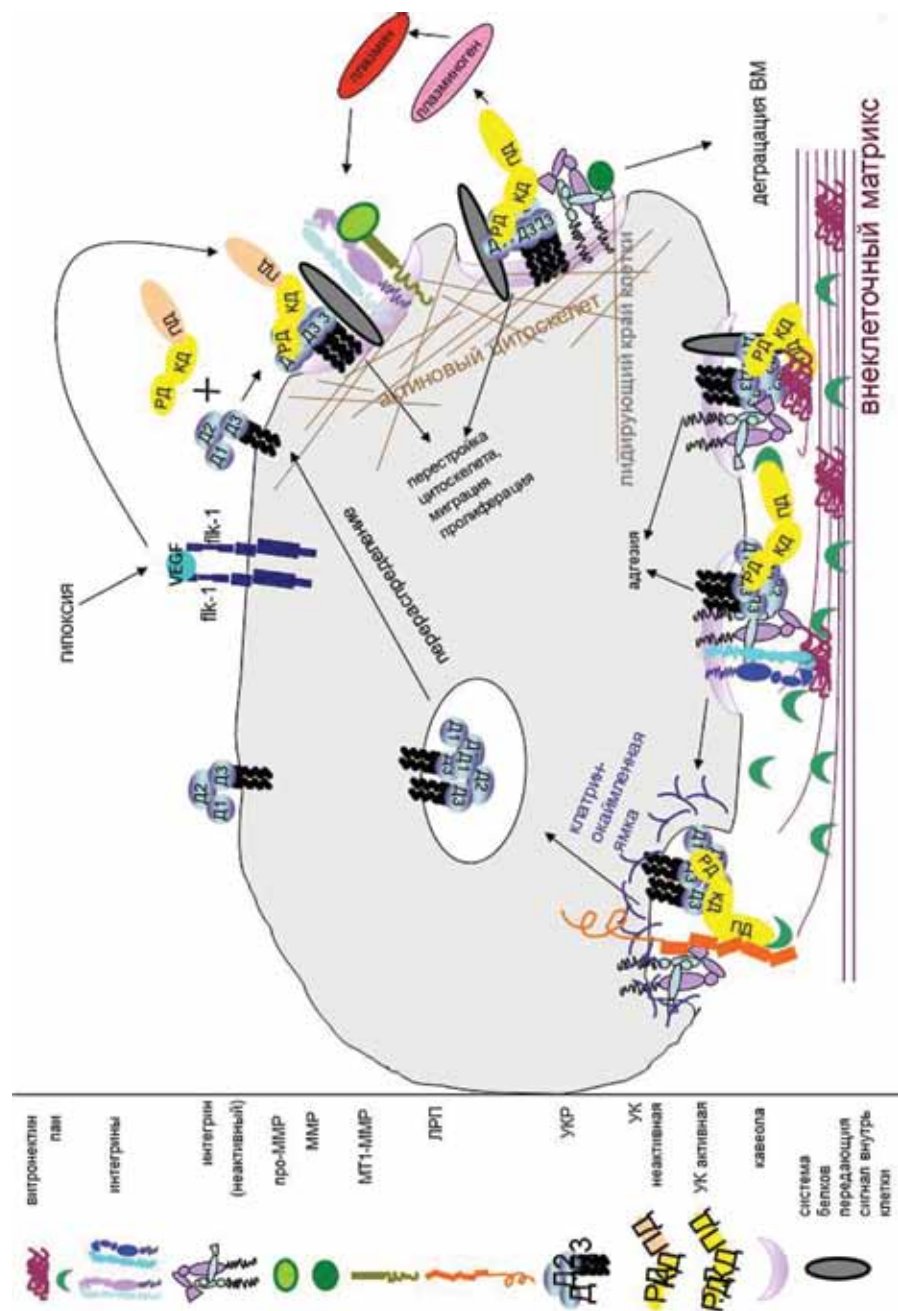


Рис. 7. Схематическое изображение одного из возможных вариантов событий в клетке, происходящих при клеточной миграции, вызванной урокиназой

с интегринами, что ведет к активации p38 MAPK [98]. Gyetko и коллеги показали, что у мышей, нокаутных по урокиназе, пролиферация Т-клеток оказалась сниженной [99]. На раковых клетках была показана способность ростового домена урокиназы запускать клеточную пролиферацию на остеобластоподобных клетках [100], клетках меланомы [101], клетках остеосаркомы человека SaOs-2, раковых клетках молочной железы [102, 103]. Причем для этого эффекта необходимым являлось фукозилирование Thr18 в ростовом домене урокиназы [104]. Gandhari и соавторы полагают, что митогенная активность урокиназы опосредуется через ERK/MAPK-сигнальный путь, запускаемый интегринами. Урокиназа может стимулировать синтез ДНК и пролиферацию ГМК сосудов независимо от протеолитической активности и взаимодействия с uPAR [101,105]. Урокиназа может также индуцировать пролиферацию клеток посредством активации комплекса uPAR/CD87, казеинкиназы-2 и транспортного белка нуклеолина [52]. Нуклеолин регулирует транскрипцию и репликацию ДНК, рост клеток и ангиогенез [32].

Многие типы клеток, выделенные из злокачественных образований у человека, таких как рак желудка, молочной железы, прямой кишки, остеосаркома и рак легкого устойчивы к *апоптозу* [106]. Недавние исследования отметили корреляцию между системой урокиназа-рецептор и чувствительностью клетки к запрограммированной смерти. Gutierrez и соавторы установили, что при имплантации клеток фибросаркомы T241 в мышь с нокаутом по урокиназе уменьшается пролиферация клеток опухоли и повышается индуцирование апоптоза [107]. При векторной трансфекции антисмысловой siRNA к урокиназе происходило снижение пролиферации и повышение апоптоза клеток рака молочной железы MDA-MB-231, а при экзогенном добавлении и инкубации этих клеток с uPA происходит активация ERK/MAP киназ [102]. Более того, при инкубировании MDA-MB-231 клеток с антителами к uPA, которые блокировали взаимодействие uPA-uPAR, наблюдалось снижение количества фосфорилированных ERK/MAP киназ и повышение апоптоза [108]. При блокировании специфическими антителами uPA или uPAR происходило одинаковое повышение апоптоза клеток. Показано, что активирование MAPK/ERK повышало экспрессию uPA и uPAR. Антиапоптозные свойства ERK/MAPK, вероятно, могут быть следствием их способности к активации киназ семейства Rsk, которые в свою очередь фосфорилируют белок BAD – ответственный за апоптоз и транскрипционный фактор CREB (cAMP response element binding protein) – ответственный за выживание клетки [109]. Оба Rsk опосредованных механизма приводят к апоптозу. Wick и соавторы показали положительную кор-

реляцию между уровнем Bcl-2 в злокачественных клетках глиомы с экспрессией металлопротеиназ и поверхностной урокиназой. Авторы предполагают, что Bcl-2 в раковых клетках способствует клеточной миграции и инвазии, влияя на экспрессию uPA и металлопротеиназ [110]. Один из важнейших факторов, опосредующий апоптоз, – рецептор гибели клеток Fas (CD95), принадлежащий к семейству TNF (фактор некроза опухоли). Этот рецептор состоит из внеклеточной части, взаимодействующей с лигандом FasL (CD95L) и внутриклеточной части, ответственной за передачу сигналов апоптоза. Barnhart и соавторы показали, что при инкубации FasL с опухолевыми клетками, которые суперэкспрессируют Fas, происходит повышение клеточной подвижности инвазии. Блокирование антителами uPA снижало данные эффекты. Авторы предполагают, что FasL может индуцировать транскрипцию генов *NF-kB*, *ERK/MAPK* и *uPA* [111]. Alfano и соавторы показали, что уровень экспрессии uPAR положительно коррелирует с устойчивостью к апоптозу в линиях клеток: эпителиальных пигментных клетках сетчатки и эмбриональных эпителиальных клетках почки. Взаимодействие урокиназы с uPAR приводило к повышению регуляции антиапоптозного Bcl-xL, фактора, который необходим для зависимой от урокиназы антиапоптозной активности [112, 113].

Ранее мы показали, что для стимуляции миграции сосудистых ГМК под действием урокиназы необходимо наличие ее протеолитически активного домена [114]. Кроме того, мы обнаружили новый сигнальный механизм вовлеченный в регуляцию пролиферации клеток и ремоделирования артерий. Используя siRNA мы доказали, что в сосудистых ГМК урокиназа стимулирует образование активных форм кислорода за счет стимуляции экспрессии NADP-оксидаз *nox1*, *nox4* и *nox22* [115] и, таким образом, стимулирует пролиферацию ГМК. На рис. 8 представлено схематическое изображение механизмов, способствующих пролиферации клеток под действием урокиназы.

Ремоделирование сосудов и урокиназа

Ремоделирование сосудов представляет собой процесс адаптации, включающий в себя тысячи структурных и функциональных изменений сосудистой стенки, которые возникают при заболеваниях, старении и повреждении сосуда [116]. Механизмы, участвующие в ремоделировании сосудистой стенки включают гиперплазию интимы и меди, изменения внеклеточного коллагена и эластина, а также эндотелиальной функции и фиброза. Из-за сложности и множественности процессов трудно обнаружить единый механизм, способствующий

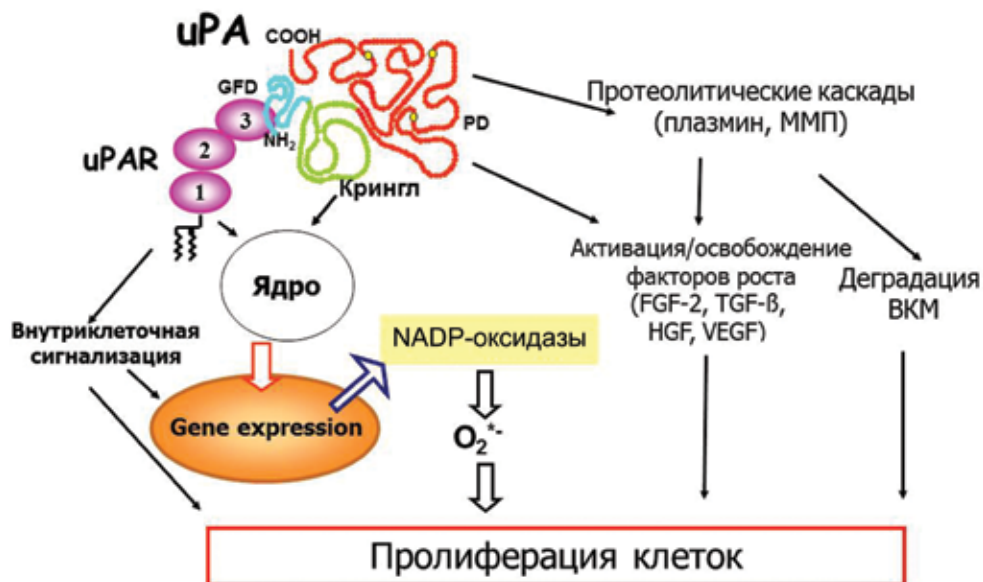


Рис. 8. Схема механизмов, способствующих пролиферации клеток под действием урокиназы. uPA – урокиназа; uPAR – рецептор урокиназы uPAR/CD87; GFD – домен, подобный фактору роста; PD – протеолитический домен; MMP – матриксные металлопротеиназы; FGF – фактор роста фибробластов; PDGF – тромбоцитарный фактор роста; HGF – фактор роста гепатоцитов; VEGF – сосудисто–эндотелиальный фактор роста; NADP – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; ВКМ – внеклеточный матрикс

ший неблагоприятному ремоделированию сосудов. Многолетние исследования функций активатора пламиногена урокиназного типа (урокиназы), а также его влияния на различные патофизиологические механизмы ремоделирования артерий привели нас к заключению, что именно урокиназа является ключевым регулятором ремоделирования в стенке сосудов после механического повреждения.

После внутрисосудистого повреждения при ангиопластике, стентировании или атерозектомии у 20–30% больных в течение 6 месяцев развивается повторное сужение просвета артерии или рестеноз [117]. Тромботическая и воспалительная реакции начинаются с момента повреждения сосуда и достигают максимума: первая – в течение первых часов, вторая – первых-вторых суток (рис. 9). При этом цитокины и факторы роста, выделяемые тромбоцитами и лейкоцитами, активируют ГМК, которые начинают пролиферировать и мигрировать из меди в интиму. Эти процессы достигают максимума на 7-й день и заканчиваются через месяц после повреждения. На второй неделе промигрировавшие клетки начинают усиленно синтезировать

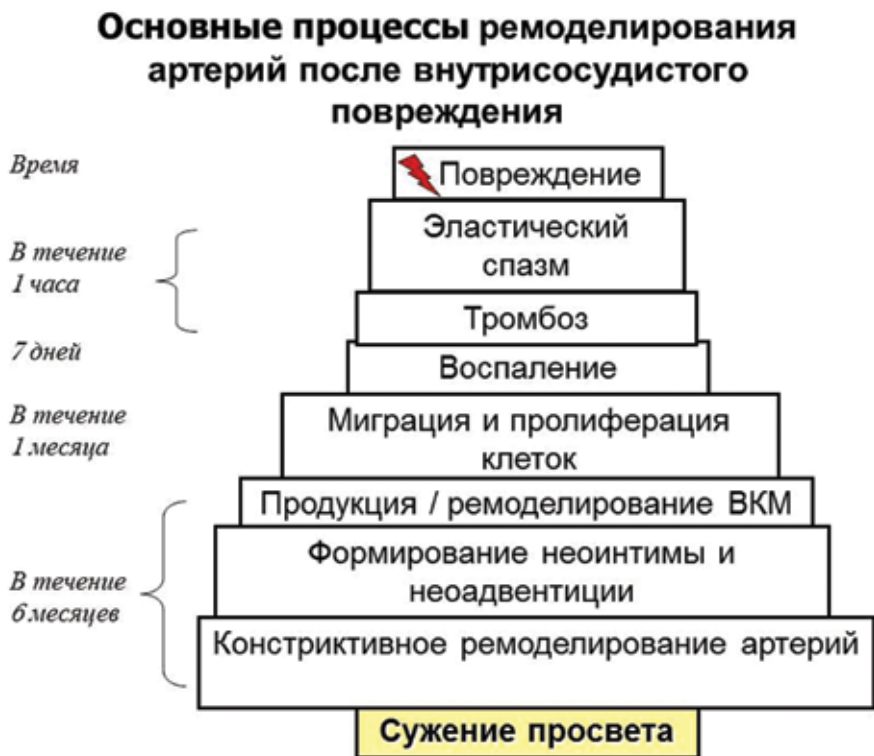


Рис 9. Ремоделирование артерий после внутрисосудистого повреждения. ВКМ – внеклеточный матрикс

матрикс, этот процесс достигает максимума через 3 месяца и продолжается около 6 месяцев. Все эти процессы приводят к развитию неоинтимы, фактически новой бляшки, и к ремоделированию сосудистой стенки, что в конечном итоге ведет к сужению просвета и возврату симптомов ишемии (стенокардии) [118]. Мы показали, что урокиназа (прямо или опосредованно – через активацию плазмينا, принимает участие во всех этих процессах.

Повышенное содержание урокиназы в периферической крови больных, подвергающихся ангиопластике и стентированию коронарных артерий, соотносится с высоким риском развития рестенозов, и является предиктором ангиографически подтвержденного коронарного рестеноза [5, 119, 120]. Мы обнаружили, что антиген урокиназы и ее активность в плазме крови существенно выше у пациентов со стенокардией, чем у здоровых добровольцев [121]. Мы и другие авторы показали, что экспрессия и активность урокиназы повышены в ГМК и макрофагах атеросклеротических, а также рестенозных

бляшек в артериях человека [122]. Было выявлено, что в атеросклеротической бляшке урокиназа экспрессируют преимущественно активированные макрофаги [123]. Повышенная экспрессия урокиназы и ее рецептора обнаруживается в атеросклеротической бляшке, что может способствовать усиленному протеолизу, обуславливающему нестабильность бляшки [123, 124]. Повышение экспрессии урокиназы макрофагами ускоряет прогрессирование атеросклероза и раннюю смерть трансгенных мышей [125]. Помимо этого, являясь фактором хемотаксиса для гладкомышечных клеток, лейкоцитов и моноцитов/макрофагов урокиназа [55, 99], экспрессированная в атеросклеротической бляшке, может способствовать миграции ГМК, еще большему привлечению моноцитов/макрофагов в бляшку и, таким образом, приводить к росту и «дестабилизации» бляшки. Урокиназа может активировать матриксные металлопротеиназы и высвободить связанные с матриксом факторы роста, в частности трансформирующий фактор роста β (TGF- β 1), основной фактор роста фибробластов и гранулоцит-макрофаг колониестимулирующий фактор, которые активно участвуют в процессах атерогенеза [75, 126]. В то же время сами факторы роста стимулируют миграцию и хемотаксис клеток и способны повышать экспрессию урокиназы моноцитами/макрофагами и гладкомышечными клетками [55, 127].

Неспецифическая воспалительная реакция сосудистой стенки на повреждение – важное звено патогенеза как рестеноза, так и атеросклероза [128, 129]. На модели экспериментальной баллонной ангиопластики мы показали, что привлечение в сосуд моноцитов может быть одним из механизмов влияния урокиназы на ремоделирование, так как моноциты являются источником цитокинов и ростовых факторов. Это подтверждается полученными нами данными о том, что урокиназа увеличивает содержание в стенке сосуда мРНК – одного из основных провоспалительных факторов, секретирующихся моноцитами/макрофагами – фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) и фермента, осуществляющего его превращение в активную форму (TACE – TNF- α converting enzyme). Нанесение урокиназы вызывало значительное увеличение экспрессии как TNF- α , так и TACE по сравнению с ее уровнем в контрольной группе, в то время как нанесение тканевого активатора плазминогена подобного эффекта не оказывало [130]. Фактор некроза опухолей- α (TNF- α), вырабатываемый моноцитами/макрофагами, нейтрофилами, а также структурными компонентами сосудистой стенки (гладкомышечными клетками и фибробластами), является важным посредником развития воспаления и вызывает образование и секрецию провоспалительных факторов (интерлейкин-10, кортикостероиды, простагландины) [131].

Несмотря на то, что и тканевой активатор плазминогена, и урокиназа активируют плазминоген с образованием плазмина, их роль в ремоделировании артерий различна. После баллонного повреждения артерии экспрессия тканевого, и урокиназного активаторов плазминогена гладкомышечными клетками меди быстро возрастает [6]. Мы показали, что экспрессия урокиназы повышается уже через 6 часов после повреждения и остается повышенной в течение 4 дней в меди и развивающейся неоинтимае [132], то есть в течение того времени, на которое приходится активная пролиферация ГМК в меди и их миграция в формирующуюся неоинтиму [6]. На модели ремоделирования артерий, индуцированного снижением кровотока, мы также обнаружили, что содержание урокиназы коррелировало с ростом неоинтимы, тогда как содержание тканевого активатора плазминогена коррелировало с позитивным ремоделированием артерий [133].

В настоящее время установлено, что урокиназа является обязательным участником реакции сосуда на повреждение [7, 134–136]. В исследованиях на трансгенных животных [137] и артериях приматов [138] было установлено, что урокиназа является ключевым фактором развития неоинтимы. Было выявлено, что отсутствие гена урокиназы, также как и отсутствие генов обоих активаторов плазминогена одновременно приводит к подавлению роста неоинтимы. Причем у этих мышей ГМК неоинтимы были лишены способности мигрировать. Неспособность ГМК дефицитных по урокиназе мышей к миграции, а следовательно и к формированию неоинтимы, может быть обусловлена участием урокиназы в расщеплении внеклеточного матрикса [137]. Трансгенная гиперэкспрессия урокиназы в интимае сосуда у кроликов с атеросклерозом стимулирует констриктивное ремоделирование артерии [123]. Связывание урокиназы с рецептором α PAR/CD87 обеспечивает направленную локальную деградацию белков внеклеточного матрикса по направлению движения клетки. Тем не менее, отсутствие гена урокиназного рецептора не оказывало влияния на ответ сосудистой стенки на повреждение по сравнению с мышами дикого типа [139]. Этот факт указывает на преимущественное значение для заживления сосудистой стенки независимых от рецептора сигнальных путей, активируемых урокиназой.

С использованием рекомбинантных форм урокиназы, которые были получены в лаборатории генной инженерии РКНПК Росмедтехнологий, а также нейтрализующих урокиназу антител, предоставленных группой инженерной иммунологии РКНПК Росмедтехнологий и рекомбинантного тканевого активатора плазминогена мы обнаружили, что в отличие от нативной урокиназы протеолитиче-

ски неактивная рекомбинантная урокиназа не стимулировала образование неоинтимы и неоадвентиции, вызывала менее выраженное, чем в контроле, утолщение меди и уменьшение просвета артерии (рис. 10). Ее эффект был ближе к эффекту нейтрализующих урокиназу антител, которые подавляли рост неоинтимы и предотвращали сужение просвета артерии, вызванное баллонированием. В то же время форма урокиназы с модифицированным GFD, неспособная связываться с урокиназным рецептором, вызывала эффекты, аналогичные нативной урокиназе [132].

Полученные данные позволили утверждать, что *in vivo* для стимуляции миграции клеток и ремоделирования артерий преимущественное значение имеет протеолитическая активность урокиназы. Эти эффекты весьма специфичны для урокиназы и, вероятно, обусловлены не только ее способностью к образованию плазмина, так как тканевой активатор плазминогена оказывал противоположное действие [140]. Оценивая влияние экзогенной урокиназы на показатели геометрического ремоделирования артерии после баллонирования, мы обнаружили, что она не только стимулирует рост неоинтимы, но вызывает констриктивное ремоделирование артерии (уменьшение площади, описываемой наружной эластичной мембраной и увеличение соотношения интима/медия). Тканевой активатор плазминогена, напротив, вызывал положительное ремоделирование, наряду с подавлением роста неоинтимы [140].

Отрицательное ремоделирование артерии является одним из основных механизмов позднего сужения просвета артерии после ангиопластики без стентирования [141]. Способность урокиназы вызывать констриктивное ремоделирование поврежденной артерии может быть обусловлена ее влиянием на адвентицию сосуда. Нанесение на адвентицию экзогенной урокиназы стимулирует ее рост, пролиферацию клеток и аккумуляцию α -актинположительных клеток и моноцитарно-макрофагальную инфильтрацию, а нейтрализующие урокиназу антитела, напротив, уменьшают количество клеток сократительного фенотипа и подавляют рост неоадвентиции в ответ на повреждение [142]. При этом, неактивная урокиназа (uPA-H/Q) и тканевой активатор плазминогена не оказывают стимулирующего влияния на аккумуляцию α -актинположительных клеток и макрофагов в поврежденной адвентиции, что указывает на определяющее значение протеолитической активности урокиназы для осуществления этих процессов.

Во многих работах показана взаимосвязь между ремоделированием сосудов и экспрессией матриксных металлопротеиназ, прежде всего ММП-2 и ММП-9, осуществляющих деградацию внеклеточ-

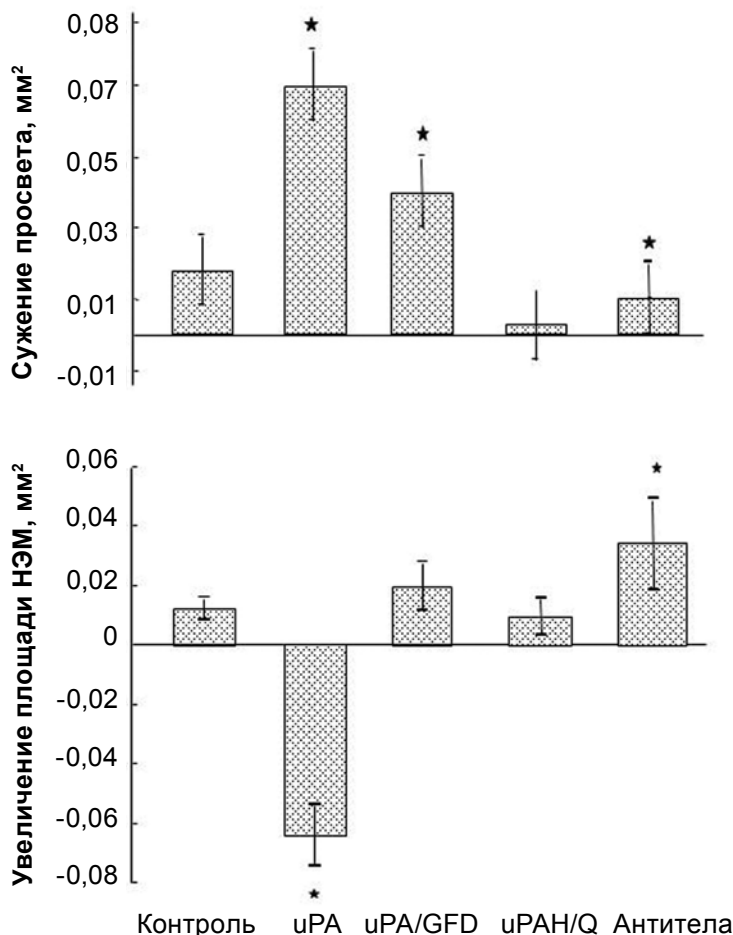


Рис. 10. Ремоделирование сонной артерии крысы после экспериментальной баллонной ангиопластики и нанесения различных форм рекомбинантной урокиназы. Представлено изменение площади просвета артерии (ПП) и площади, описываемой наружной эластичной мембраной (НЭМ), сонной артерии крысы на 4-е сутки после баллонирования и нанесения урокиназы нативной (uPA), с модифицированным ростовым доменом (uPA/GFD), протеолитически неактивной (uPA H/Q) и нейтрализующих ее антител. Контроль – нанесение чистого геля. * $P < 0,05$. В каждой группе по 9 животных

ного матрикса [143–145]. Вовлечение системы матриксных металлопротеиназ в процесс заживления раны после баллонного повреждения доказывает и тот факт, что увеличение экспрессии ингибитора ММП – TIMP-1 подавляет развитие неоинтимы [146], в то время как у мышей с дефицитом TIMP-1 образование неоинтимы после

электрического повреждения бедренной артерии было более выраженным. Использование различных ингибиторов ММП приводило к замедлению образования неоинтимы и подавлению миграции гладкомышечных клеток [147]. Известно также, что между фибринолитической системой (системой активаторы плазминогена–плазмин) и системой матриксных металлопротеиназ существует тесное функциональное взаимодействие [139, 144]. Ранее было показано, что урокиназа может независимо от плазмина благодаря собственной протеолитической активности активировать ММП [148]. Мы показали влияние урокиназы на экспрессию мРНК ММП-9 в клетках моноцитарных линий [70–72]. Кроме того, в нашем исследовании *in vivo* мы обнаружили, что активаторы плазминогена по-разному влияют на экспрессию и активацию ММП-2 и ММП-9 в баллонированной сонной артерии крысы [149]. Так, возрастание в поврежденном сосуде урокиназы стимулирует увеличение экспрессии ММП-2 и образование активных форм ММП-2 и ММП-9 в ранние сроки после баллонирования. Увеличение в сосуде тканевого активатора плазминогена, напротив, уменьшает экспрессию ММП-2 и не влияет на образование активных форм этих ферментов. Этот факт позволил нам предположить, что урокиназа и тканевой активатор плазминогена могут по-разному влиять на экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в ремоделировании артерий.

Для выяснения механизмов различного влияния активаторов плазминогена на ремоделирование сосудов, мы провели исследование экспрессии генов в баллонированном сосуде при нанесении на него урокиназы и тканевого активатора плазминогена. Мы обнаружили, что урокиназа оказывала влияние на экспрессию обширной группы провоспалительных генов и генов, регулирующих метаболизм митохондрий и оксидативный стресс [150]. Изменение экспрессии генов, участвующих в регуляции воспаления, под действием урокиназы и отсутствие подобных изменений под действием тканевого активатора плазминогена свидетельствует о том, что воспалительный каскад, вероятно, вовлечен в стимуляцию роста неоинтимы, констриктивное ремоделирование и, как следствие, уменьшение просвета артерии под действием урокиназы.

Недавние исследования показали, что оксидативный стресс, возникающий в ответ на повреждение сосудистой стенки, играет важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, поскольку способствует неблагоприятному ремоделированию сосудов [151]. Известно, что образование супероксид-радикала является одним из ключевых процессов, регулирующих сосудистый тонус и пролиферацию ГМК в стенке сосуда [152]. Повышенная экспрес-

сия NADP-оксидаз в баллонированной артерии представляет собой важный механизм сигнализации, регулирующей рост неоинтимы, ремоделирование артерии и атерогенез [153]. Мы обнаружили, что стимуляция образования АФК и регуляция экспрессии генов, оказывающих влияние на оксидативный стресс, в поврежденной артерии после экспериментальной баллонной ангиопластики *in vivo*, опосредуют усиленное деление клеток под действием урокиназы [115, 154]. Этот новый редоксзависимый механизм действия урокиназы может оказаться ключевым в регуляции роста неоинтимы и развитии неблагоприятного ремоделирования сосудистой стенки. Мы показали, что урокиназа способна повышать экспрессию NAD(P)H оксидаз и продукцию активных форм кислорода (АФК) и регулировать пролиферацию ГМК как аутокринный фактор роста. Недавно нами были получены новые данные, расширяющие представления о сигнальных путях, регулируемых урокиназой, и указывающие на уникальную и многофункциональную природу урокиназы. Мы показали, что урокиназа способна транслоцироваться в ядро и, таким образом, регулировать экспрессию генов [32].

На рис. 11 суммированы механизмы влияния урокиназы на ремоделирование артерий.

Ангиогенез и урокиназа

Ангиогенез представляет собой образование новых капилляров от посткапиллярных венул, которое осуществляется через активацию эндотелиальных клеток, экспрессию в них протеиназ, деградацию внеклеточного матрикса, пролиферацию и миграцию этих клеток, образование ими первичных высокопроницаемых сосудистых структур, последующую стабилизацию и «взросление» этих структур за счет привлечения перicyтов и ГМК, а также организации их в сложную трехмерную сосудистую сеть [155]. Основным стимулом к ангиогенезу при физиологических и патологических состояниях является недостаток кислорода (гипоксия или ишемия), который через активатор транскрипции факторов ангиогенеза – индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), индуцирует экспрессию многих ангиогенных факторов и, прежде всего, основного регулятора ангиогенеза как в эмбриональном, так и в постнатальном периоде развития организма – VEGF и его рецепторов. VEGF избирательно стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток (ЭК), их предшественников и моноцитов, экспрессирующих рецепторы к нему, увеличивает сосудистую проницаемость, способствуя пропотеванию белков плазмы в околососудистое пространство, необходимое для миграции ЭК, индуцирует экспрессию эндотелиальной NO-синтазы



Рис. 11. Механизмы регуляции роста и ремоделирования артерий под действием урокиназы. *uPA* – урокиназа; *uPAR* – рецептор урокиназы *uPAR/CD87*; *ВКМ* – внеклеточный матрикс; *ММП* – матриксные металлопротеиназы

и образование NO, что способствует вазодилатации и стимулирует экспрессию протеиназ, разрушающих связи между ЭК и внеклеточным матриксом, что необходимо для направленной миграции клеток.

Для инициации процесса ангиогенеза необходима дестабилизация сосуда – ослабление межклеточных контактов между эндотелиальными клетками, разрушение базальной мембраны, а также локальный протеолиз матриксных белков для того, чтобы эндотелиальные клетки или их предшественники из циркулирующей крови могли мигрировать и формировать новые сосуды [156, 157]. Поэтому ангиогенез невозможен без активации внеклеточного протеолиза, осуществляющегося за счет катализируемого урокиназой образования плазмина на поверхности клетки. Известно, что урокиназа и ее рецептор играют важную роль в процессах ангиогенеза [155]. Эндотелиальные клетки, в которых гиперэкспрессирована урокиназа, характеризуются большей инвазивностью *in vitro*, чем интактные [158]. В клинических исследованиях показано, что экспрессия уроки-

назного рецептора характерна для наиболее «агрессивных» клеток в опухоли и для сосудов, растущих по ее краю, и может быть маркером активного опухолевого ангиогенеза и метастазов [159]. Известно, что инфильтрация тканей моноцитами/макрофагами, секретирующими ангиогенные факторы, способствует ангиогенезу [160], а циркулирующие моноциты играют определенную роль в развитии коллатералей [161]. Урокиназа и ее рецептор стимулируют аккумуляцию моноцитов/макрофагов в тканях и участвуют в развитии воспалительного ответа как при ремоделировании артерий, так и при ангиогенезе [5, 162]. Урокиназа и образовавшийся под ее действием плазмин инициируют разрушение белков базальной мембраны, таких как фибронектин и ламинин. Они также могут активировать и/или высвободить латентные матриксные металлопротеиназы, а также ангиогенные факторы роста, в частности VEGF, bFGF, HGF, TGF β и PDGF, которые в свою очередь способствуют миграции эндотелиальных клеток, их инвазии и пролиферации [18,73,75,77,81,95,155]. Урокиназа опосредует ангиогенные эффекты некоторых факторов роста благодаря как протеолитической активности, так и своим непротеолитическим свойствам.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что урокиназа как ключевой регулятор внеклеточного протеолиза и ремоделирования тканей является фактором, опосредующим сигналы к запуску ангиогенеза [5, 155]. Повышение экспрессии урокиназы в эндотелиальных клетках увеличивает их инвазивный потенциал, а добавление антител, блокирующих урокиназный рецептор или протеолитическую активность урокиназы, может подавлять миграцию эндотелиальных клеток и образование капиллярноподобных структур [163, 164]. Блокада урокиназного рецептора (uPAR/CD87) с помощью специфических антител подавляет индуцируемые фактором роста фибробластов (bFGF) и эндотелиальным фактором роста сосудов (VEGF) миграцию эндотелиальных клеток и образование капиллярноподобных трубочек в фибриновом матриксе [165]. Также было показано, что в клетках эндотелия урокиназа активирует MAP-киназную сигнализацию посредством связывания с uPAR/CD87 и активации протеинкиназы C благодаря протеолитической активности урокиназы, что ведет к миграции эндотелиальных клеток и ангиогенезу [40]. У мышей, нокаутированных по гену урокиназы, подавлен ангиогенез в ишемизированной конечности и ангиогенез в сердце, а VEGF не способен стимулировать ангиогенез в периинфарктной зоне, в то время как у диких мышей он оказывает выраженный ангиогенный эффект [166]. Кроме того, VEGF стимулирует экспрессию урокиназы в сосудистых эндотелиальных клетках [167].

Ангиогенез в сетчатке, индуцированный HGF, также опосредован увеличением активности урокиназы [168]. Нарушение взаимодействия урокиназы с ее рецептором ингибирует усиление миграционной и инвазивной активности эндотелиальных клеток под действием HGF. Эти данные подтверждают, что урокиназа опосредует ангиогенные эффекты факторов роста. Урокиназа может также стимулировать ангиогенез благодаря активации внутриклеточной сигнализации в эндотелиальных клетках [40].

Мы изучали эффекты внутримиекардиального и внутримышечного введения плазмидной конструкции с комплементарной ДНК (кДНК) урокиназы (человека, крысы и мыши) на моделях ишемии задней конечности у мыши и крысы и инфаркта миокарда (ИМ) у крысы [164,169]. Было показано, что урокиназа стимулирует развитие капилляров и артериол и увеличивает аккумуляцию макрофагов в периинфарктной зоне, уменьшает размер формирующегося ИМ, увеличивает васкуляризацию, ускоряет восстановление перфузии и предотвращает развитие некроза в ишемизированной конечности (рис. 12).

Эффективность плазмидной конструкции с геном урокиназы была близка к эффективности подобной конструкции, содержащей ген VEGF, при этом урокиназа не вызывала отек конечности. Следует особо подчеркнуть, что ни в одном из случаев введения плазмид при ИМ и ишемии конечности не было отмечено формирования ангиом. Полученные результаты свидетельствовали о том, что генная терапия путем прямых внутримиекардиальных/внутримышечных инъекций раствора плазмиды с кДНК урокиназы может эффективно стимулировать ангио- и артериогенез и улучшать перфузию ишемизированных тканей. Мы предполагаем, что преходящее увеличение содержания урокиназы в ишемизированных тканях может привести к стимуляции ангио- и артериогенеза благодаря активации латентных и высвобождению связанных в матриксе ангиогенных факторов роста; к активации ММП, стимуляции миграции и пролиферации ЭК и ГМК сосудов; потенцированию действия ангиогенных факторов; привлечению моноцитов в участок ишемии и последующей секреции ими ангиогенных факторов и цитокинов; предотвращению тромбоза сосудов, который служит дополнительным фактором, усугубляющим ишемию тканей при нарушениях магистрального кровотока. Использование комбинированной генной терапии VEGF с урокиназой позволяет в 2 раза снизить дозу плазмиды VEGF без потери эффективности и уменьшить побочное действие терапии VEGF, проявляющееся в развитии отеков. На основе плазмидных генетических конструкций с кДНК урокиназы и VEGF-165 созда-

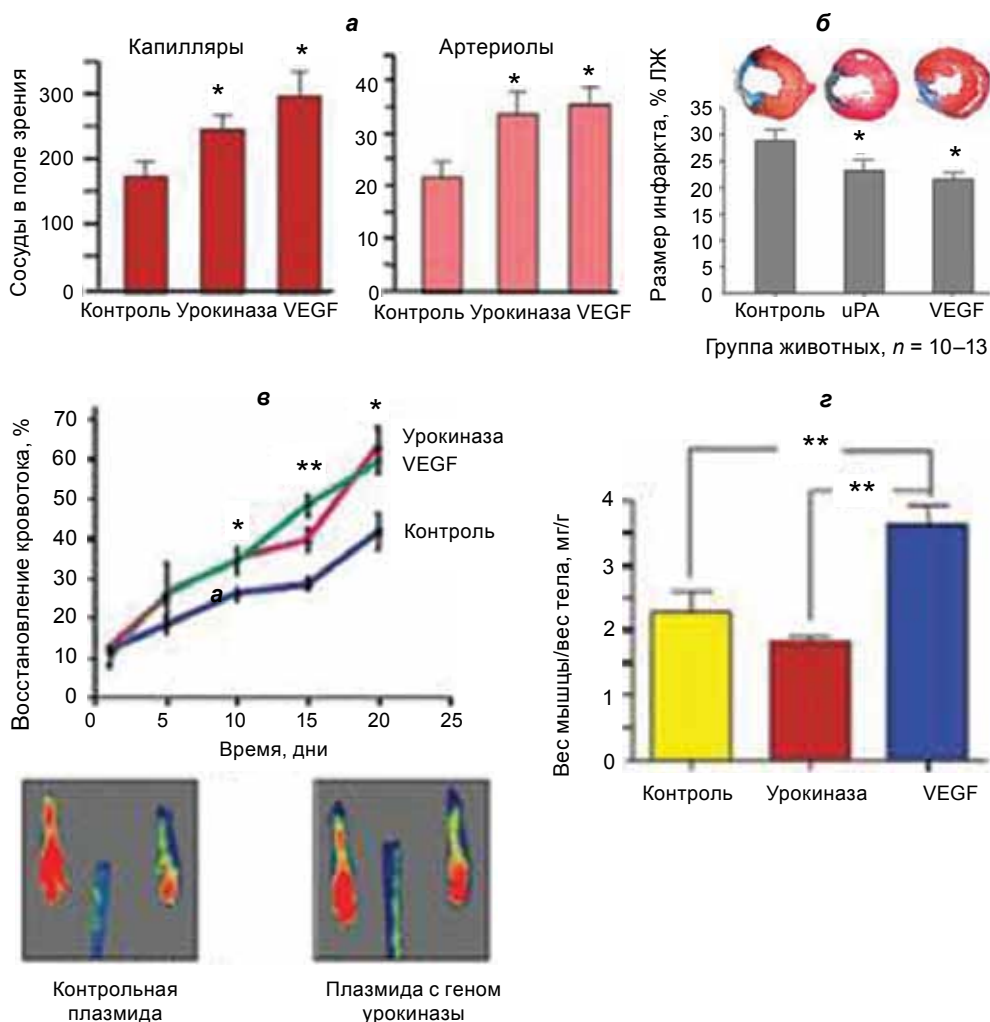


Рис. 12. Влияние прямого введения плазмид с генами урокиназы и VEGF на ангиоартериогенез в сердце крысы и ишемизированной конечности мыши. **а** – Количество капилляров и артериол в периинфарктной зоне на 14-й день после ИМ и введения плазмид (* $P < 0,05$). **б** – Размер формирующегося постинфарктного рубца на 14-е сут после перевязки ПНА и инъекции плазмид. Данные представлены в виде отношения площади рубца к площади ЛЖ на поперечных срезах сердца. Вверху – окраска срезов сердца по Маллори: богатая коллагеном область рубца окрашивается в синий цвет, а жизнеспособный миокард ЛЖ – в красный. **в** – восстановление перфузии подошвенной области ишемизированной левой конечности мыши (лазерное доплеровское сканирование, пример внизу) после введения плазмид. За 100% принят кровоток в неишемизированной правой конечности; **г** – оценка развития отека по изменению соотношения массы мышцы к массе тела мыши. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

ны лекарственные препараты для генной терапии, которые прошли токсикологические исследования и планируются для клинических испытаний у больных с ишемией нижних конечностей.

С другой стороны, «связывающий пептид», образующийся в результате протеолитического разрушения урокиназы плазмином или металлопротеиназами в положениях Lys135–Lys136 или Glu143–Leu144, блокирует взаимодействие урокиназы с ее рецептором и вызывает подавление миграции эндотелиальных клеток и ангиогенеза *in vivo*, стимулированных ангиогенными факторами роста, в том числе в опухолях [64]. В то же время, было обнаружено, что «связывающий пептид» способен запускать внутриклеточную сигнализацию и стимулировать миграцию, связываясь с $\alpha\beta 5$ интегрином, кроме того, при этом взаимодействии усиливается миграция, вызываемая ростовым доменом урокиназы при связывании с рецептором урокиназы [170]. Как было обнаружено в последнем исследовании, разные участки молекулы урокиназы, входящие в состав «связывающего пептида» по-разному влияют на клеточную миграцию. Так, участки 135–143 и 135–158 ингибируют, тогда, как участок 144–158 стимулирует клеточную миграцию, что может представлять собой уникальный механизм регуляции миграции в зависимости от условий, в которых происходит разный протеолитический процессинг молекулы урокиназы [171].

Крингл и аминотерминальные фрагменты урокиназы, не содержащие «связывающего пептида», могут подавлять миграцию эндотелиальных клеток и формирование капиллярноподобных структур [165,172]. Недавно нами получены данные о негативном влиянии протеолитически неактивных рекомбинантных форм урокиназы (uPA HQ и аминотерминального фрагмента) на спонтанную миграцию эндотелиальных клеток. Мы показали способность аминотерминального фрагмента подавлять стимулированный основным фактором роста фибробластов ангиогенез *in vitro*. Полученные результаты указывают на возможность использования синтезированных нами протеолитически неактивных рекомбинантных конструкций урокиназы для регуляции миграции эндотелиальных клеток и подавления неоангиогенеза.

Таким образом, многочисленные исследования показали, что урокиназа, являясь мультидоменным многофункциональным белком, регулирует клеточную адгезию, миграцию и пролиферацию, благодаря своей специфической протеолитической активности, образованию плазмينا, расщеплению внеклеточного матрикса, связыванию с рецепторами, взаимодействиям ее доменов друг с другом, с белками матрикса и интегринными, а также активации сложной

внутриклеточной сигнализации. Многие эффекты урокиназы могут быть обусловлены ее ядерной транслокацией, взаимодействием с факторами транскрипции и ее влиянием на экспрессию генов. Все эти свойства урокиназы определяют ее ключевое значение в процессах роста и ремоделирования сосудов. Учитывая роль урокиназы в сосудистом ремоделировании препараты, направленные на ингибирование урокиназы, при локальном использовании могут предотвращать рестенозирование после баллонной ангиопластики. Известно, что атеросклеротические бляшки имеют систему кровоснабжения, а экспериментальное подавление кровоснабжения атеросклеротических бляшек может приводить к уменьшению их размеров в 3–4 раза. Таким образом, подавление ангиогенеза, индуцируемого урокиназой, можно рассматривать как возможный способ лечения атеросклероза и злокачественных новообразований. В то же время локальная генная терапия с использованием конструкций урокиназы, в том числе ее мутантных форм, чрезвычайно перспективна для стимуляции ангиогенеза при ишемических заболеваниях, учитывая отсутствие побочных эффектов, которыми обладают факторы роста при их терапевтическом использовании. Мультидоменная структура урокиназы и ее ключевая регуляторная роль в сосудистой стенке предоставляют уникальные возможности как для исследования механизмов функционирования сосудистой стенки, так и для разработки новейших терапевтических подходов для практического использования урокиназы и ее фрагментов в медицинской практике для лечения различных патологий.

ROLE OF MULTIDOMAIN STRUCTURE OF UROKINASE IN REGULATION OF GROWTH AND REMODELING OF VESSELS

*V. A. Tkachuk^{1,2}, O. S. Plekhanova¹, I. B. Beloglazova¹,
E. V. Parfenova¹*

¹Russian Cardiologic Research-Production Complex,
RF Ministry of Public Health, Moscow, Russia;

²Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow
State University, Russia;
e-mail: plekhanova@mail.ru

Urokinase type plasminogen activator, or urokinase (uPA), is a multifunctional protein which plays special regulatory role in the vascular wall and can actuate the proteolytic and signal cascades. The authors' results and literature data concerning the role of urokinase in remodeling blood vessels and angiogenesis are summarized in the paper. At the present stage

urokinase may be considered as a promising target for the effects directed to prophylaxis of restenoses, to preventing of negative remodeling of arteries, stimulation of vessels growth under the ischemic diseases and suppression of angiogenesis under oncologic diseases.

Литература

1. *Astrup T., Sterndorff I.* // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1952. – **81**, N 3. – P. 675–678.
2. *Kaulla K.* // J. Lab. Clin. Med. – 1954. – **44**. – P. 944–946.
3. *Ploug J., Kjeldgaard N.* // Arch. Biochem. Biophys. – 1956. – **62**, N 2. – P. 500–511.
4. *Schultz R., Von Kaulla Kn.* // Biochem. J. – 1958. – **68**, N 2. – P. 218–221.
5. *Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Ткачук В. А.* // Биохимия. – 2002. – **67**, № 1. – С. 119–134.
6. *Clowes A. W., Clowes M. M., Au Y. P. et al.* // Circ. Res. – 1990. – **67**. – P. 61–67.
7. *Ткачук В., Степанова В., Литтл П. Дж. и др.* // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 1996. – **23**. – P. 759–765.
8. *Lijnen H. R., Van Hoef B., Nelles L. et al.* // J. Biol. Chem. . – 1990. – **265**. – P. 5232–5236.
9. *Kuzuya M., Iguchi A.* // J. Atheroscler. Thromb. – 2003. – **10**. – P. 275–282.
10. *Kline T. P., Brown F. K., Brown S. C. et al.* // Biochemistry. – 1990. – **29**. – P. 7805–7813.
11. *Mukhina S., Stepanova V., Traktouev D. et al.* // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 16450–16458.
12. *Stephens R. W., Bokman A. M., Myohanen H. T. et al.* // Biochemistry. – 1992. – **31**. – P. 7572–7579.
13. *Mimuro J., Kaneko M., Murakami T. et al.* // Biochem. Biophys. Acta. – 1992. – **1160**. – P. 325–334.
14. *Kwak S. H., Mitra S., Bdeir K. et al.* // J. Leukoc. Biol. – 2005. – **78**. – P. 937–945.
15. *Pluskota E., Soloviev D. A., Bdeir K. et al.* // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**. – P. 18063–18072.
16. *Bdeir K., Kuo A., Sachais B. S. et al.* // Blood. – 2003. – **15**. – P. 3600–3608.
17. *McLean J. W., Tomlinson J. E., Kuang W.-J. et al.* // Nature. – 1987. – **230**. – P. 132–137.
18. *Appella E., Robinson E. A., Ullrich S. J.* // J. Biol. Chem. – 1987. – **262**. – P. 4437–4440.
19. *Vassalli J. D., Baccino D., Belin D.* // J. Cell Biol. – 1985. – **100**. – P. 86–92.
20. *Varinka C., Parry G., Callahan J. et al.* // J. Mol. Biol. – 2006. – **363**. – P. 482–495.
21. *Magdolen V., Rettenberger P., Koppitz M. et al.* // Eur. J. Biochem. – 1996. – **237**. – P. 743–751.
22. *Белоглазова И. Б., Бибилашвили Р. Ш., Гурский Я. Г. и др.* // Биохимия. – 2013. – **78**, № 5. – С. 575–591.

23. Степанова В. В., Белоглазова И. Б., Гурский Я. Г. и др. // Биохимия. – 2008. – **73**. – С. 311–321.
24. Kjaergaard M., Hansen L. V., Jacobsen B. et al. // Front. Biosci. – 2008. – **13**. – P. 5441–5461.
25. Xu X., Gerdsvoll H., Yuan C. et al. // J. Mol. Biol. – 2012. – **416**, N 5. – P. 629–641.
26. Cubellis M. V., Nolli M. L., Cassani G. et al. // J. Biol. Chem. – 1986. – **261**. – P. 15819–15822.
27. Poliakov A., Tkachuk V., Ovchinnikova T. et al. // Biochem. J. – 2001. – **355**. – P. 639–645.
28. Sitrin R. G., Pan P. M., Harper H. A. et al. // J. Immunol. – 2000. – **165**. – P. 3341–3349.
29. Ghosh S., Brown R., Jones J. C. et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 23869–23876.
30. May A. E., Kanse S. M., Lund L. R. et al. // J. Exp. Med. – 1998. – **188**. – P. 1029–1037.
31. Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Меньшиков М. Ю. и др. // Рос. физиол. журн. – 2009. – **95**, № 5. – С. 442–464.
32. Stepanova V., Lebedeva T., Kuo A. et al. // Blood. – 2008. – **112**. – P. 100–110.
33. Conese M., Nykjaer A., Petersen C. M. // J. Cell Biol. – 1995. – **131**. – P. 1609–1622.
34. Nykjaer A., Conese M., Christensen E. I. // EMBO J. – 1997. – **16**. – P. 2610–2620.
35. Gotthardt M., Trommsdorff M., Nevitt M. F. // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**. – P. 25616–25624.
36. Binder B. R., Mihaly J., Prager G. W. // Thromb. Haemost. – 2007. – **97**, N 3. – P. 336–342.
37. Resnati M., Guttinger M., Valcamonica S. et al. // EMBO J. – 1996. – **15**. – P. 1572–1582.
38. Goretzki L., Mueller B. M. // Biochem. J. – 1998. – **336**, Pt2. – P. 381–386.
39. Goncharova E. A., Vorotnikov A. V., Gracheva E. O. et al. // Biol. Chem. – 2002. – **383**. – P. 115–126.
40. Tang H., Kerins D. M., Hao Q. et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**. – P. 18268–18272.
41. Tarui T., Andronicos N., Czekay R. P. et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, N 32. – P. 29863–29872.
42. Reinartz J., Schafer B., Batrla R. et al. // Exp. Cell Res. – 1995. – **220**. – P. 274–282.
43. Wei Y., Lukashev M., Simon D. I. et al. // Science. – 1996. – **273**. – P. 1551–1555.
44. Xue W., Mizukami I., Todd R. F. 3rd. et al. // Cancer Res. – 1997. – **57**. – P. 1682–1689.
45. Yebra M., Goretzki L., Pfeifer M. et al. // Exp. Cell Res. – 1999. – **250**. – P. 231–240.
46. Nguyen D. H., Catling A. D., Webb D. J et al. // J. Cell Biol. – 1999. – **146**. – P. 149–164.

47. *Wei Y., Eble J. A., Wang Z. et al.* // *Mol. Biol. Cell.* – 2001. – **12**. – P. 2975–2986.
48. *Zhang F., Tom C. C., Kugler M. C. et al.* // *J. Cell Biol.* – 2003. – **163**. – P. 177–188.
49. *Ragno P.* // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2006. – **63**. – P. 1028–1037.
50. *Bohuslav J., Horejsi V., Hansmann C. et al.* // *J. Exp. Med.* – 1995. – **181**. – P. 1381–1390.
51. *Simon D. I., Wei Y., Zhang L. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 10228–10234.
52. *Dumler I., Stepanova V., Jerke U.* // *Curr. Biol.* – 1999. – **9**. – P. 1468–1476.
53. *Behrendt N.* // *Biol. Chem.* – 2004. – 385, N 2. – P. 103–136.
54. *Gerdsvoll H., Gilquin B., Le Du. M. H. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, N 28. – P. 19260–19272.
55. *Stepanova V., Bobik A., Bibilashvily R. et al.* // *FEBS Lett.* – 1997. – **414**, N 2. – P. 471–474.
56. *Poliakov A. A., Mukhina S. A., Traktouev D. O. et al.* // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* – 1999. – **19**, N 6. – P. 939–951.
57. *Lillis A. P., Mikhailenko I., Strickland D. K.* // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – **3**, N 8. – P. 1884–1893.
58. *Kapustin A., Stepanova V., Aniol N. et al.* // *Biochem. J.* – 2012. – **443**, N 2. – P. 491–503.
59. *Budatha M., Roshanravan S., Zheng Q. et al.* // *J. Clin. Invest.* – 2011. – **121**, N 5. – P. 2048–2059.
60. *Wan W., Yanagisawa H., Gleason R. L. Jr.* // *Ann. Biomed. Eng.* – 2010. – **38**, N 12. – P. 3605–3617.
61. *Schluterman M. K., Chapman S. L., Korpanty G. et al.* // *Dis. Model. Mech.* – 2010. – **3**, N 5–6. – P. 333–342.
62. *Yanagisawa H., Schluterman M. K., Brekken R. A.* // *J. Cell. Commun. Signal.* – 2009. – **3**, N 3–4. – P. 337–347.
63. *Tarui T., Akakura N., Majumdar M. et al.* // *Thromb. Haemost.* – 2006. – **95**, N 3. – P. 524–534.
64. *Carriero M. V., Franco P., Votta G. et al.* // *Curr. Drug Targets.* – 2011. – **12**, N 12. – P. 1761–1771.
65. *Takada Y.* // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2012. – P. 136302.
66. *Stephens R. W., Pöllänen J., Tapiovaara H. et al.* // *J. Cell Biol.* – 1989. – **108**. – P. 1987–1995.
67. *Félez J.* // *Fibrinolysis Proteolysis.* – 1998. – **12**. – P. 183–189.
68. *Chapman H. A.* // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1997. – **9**. – P. 714–724.
69. *Lijnen H. R., Maquoi E., Hansen L. B. et al.* // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2002. – **22**. – P. 374–379.
70. *Меньшиков М. Ю., Елизарова Е. П., Кудряшова Е. А. и др.* // *Биохимия.* – 2001. – **66**, № 9. – С. 954–959.
71. *Menshikov M., Elizarova E., Plakida K. et al.* // *Biochem. J.* – 2002. – **367**. – P. 833–839.
72. *Menshikov M., Torosyan N., Elizarova E. et al.* // *J. Vasc. Res.* – 2006. – **43**, N 5. – P. 482–490.

73. Naldini L., Tamagnone L., Vigna E. et al. // EMBO J. – 1992. – **11**. – P. 4825–4833.
74. Plouët J., Moro F., Bertagnolli S. et al. // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**. – P. 13390–13396.
75. Sato Y., Rifkin D. B. // J. Cell Biol. – 1989. – **109**. – P. 309–315.
76. Pendurthi U. R., Tran T. T., Post M. et al. // Cancer Res. – 2005. – **65**. – P. 9705–9711.
77. Odekon L. E., Sato Y., Rifkin D. B. // J. Cell Physiol. – 1992. – **150**. – P. 258–263.
78. Okada S. S., Grobmyer S. R., Barnathan E. S. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1996. – **16**. – P. 1269–1276.
79. Busso N., Masur S.K., Lazega D. // J. Cell Biol. – 1994. – **126**. – P. 259–270.
80. Resnati M., Pallavicini I., Wang J. M. et al. // PNAS – 2002. – **99**. – P. 1359–1364.
81. Kiyon J., Kiyon R., Haller H. et al. // EMBO J. – 2005. – **24**. – P. 1787–1797.
82. Jo M., Thomas K. S., O'Donnell D. M. et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**. – P. 1642–1646.
83. Roztocil E., Nicholl S. M., Davies M. G. // J. Surg. Res. – 2007. – **141**. – P. 83–90.
84. Ossowski L., Aguirre Ghiso J., Liu D. et al. // Medicina (B Aires). – 1999. – **59**. – P. 547–552.
85. Dumler I., Weis A., Mayboroda O.A. et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**. – P. 315–321.
86. Koshelnick Y., Ehart M., Hufnagl P. et al. // J. Biol. Chem. – 1997. – **272**. – P. 28563–28567.
87. Frame M. C., Fincham V. J., Carragher N. O. et al. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2002. – **3**. – P. 233–245.
88. Parsons J. T., Martin K. H., Slack J. K. et al. // Oncogene – 2000. – **19**. – P. 5606–5613.
89. Slack J. K., Adams R. B., Rovin J. D. et al. // Oncogene – 2001. – **20**. – P. 1152–1163.
90. Fazlioli F., Resnati M., Sidenius N. et al. // EMBO J. – 1997. – **16**. – P. 7279–7286.
91. Kjølner L., Hall A. // J. Cell Biol. – 2001. – **152**. – P. 1145–1157.
92. Willnow T. E., Nykjaer A., Herz J. // Nat. Cell Biol. – 1999. – **1**. – P. 157–162.
93. Ma Z., Thomas K.S., Webb D. J. et al. // J. Cell Biol. – 2002. – **159**. – P. 1061–1070.
94. Bajou K., Masson V., Gerard R. D. et al. // J. Cell Biol. – 2001. – **152**. – P. 777–784.
95. Alexander R. A., Prager G. W., Mihaly-Bison J. et al. // Cardiovasc. Res. – 2012. – **94**, N 1. – P. 125–135.
96. Kirchheimer J. C., Wojta J., Christ G. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – **86**. – P. 5424–5428.
97. Kirchheimer J. C., Wojta J., Christ G. et al. // Carcinogenesis. – 1988. – **9**. – P. 2121–2123.
98. Aguirre-Ghiso J. A., Liu D., Mignatti A. et al. // Mol. Biol. Cell. – 2001. – **12**. – P. 863–879.

99. Gyetko M. R., Sud S., Chen G. H. et al. // J. Immunol. – 2002. – **168**. – P. 801–809.
100. Rabbani S. A., Desjardins J., Bell A. W. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1990. – **173**. – P. 1058–1064.
101. Koopman J. L., Slomp J., Anton C. W. et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**. – P. 33267–33272.
102. Arens N., Gandhari M., Bleyl U. et al. // Int. J. Oncol. – 2005. – **26**. – P. 113–119.
103. Gandhari M., Arens N., Majety M. et al. // Int. J. Oncol. – 2006. – **28**. – P. 1463–1470.
104. Rabbani S. A., Mazar A. P., Bernier S. M. et al. // J. Biol. Chem. – 1992. – **267**. – P. 14151–14156.
105. Kanse S. M., Benzakour O., Kanthou C. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1997. – **17**. – P. 2848–2854.
106. Khwaja A., Rodriguez-Viciana P., Wennstrom S. et al. // EMBO J. – 1997. – **16**. – P. 2783–2793.
107. Gutierrez L. S., Schulman A., Brito-Robinson T. et al. // Cancer Res. – 2000. – **60**. – P. 5839–5847.
108. Ma Z., Webb D. J., Jo M., Gonias S. L. // J. Cell Sci. – 2001. – **114**. – P. 3387–3396.
109. Bonni A., Brunet A., West A. E. et al. // Science. – 1999. – **286**. – P. 1358–1362.
110. Wick W., Wagner S., Kerkau S. et al. // FEBS lett. – 1998. – **440**. – P. 419–424.
111. Barnhart B. C., Legembre P., Pietras E. et al. // EMBO J. – 2004. – **23**. – P. 3175–3185.
112. Alfano D., Iaccarino I., Stoppelli M. P. // J. Biol. Chem. – 2006. – **281**. – P. 17758–17767.
113. Almholt K., Lund L. R., Rygaard J. et al. // Int. J. Cancer. – 2005. – **113**. – P. 525–532.
114. Stepanova V., Mukhina S., Köhler E. et al. // Mol. Cell Biochem. – 1999. – **195**, N 1–2. – P. 199–206.
115. Menshikov M., Plekhanova O., Cai H. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2006. – **26**. – P. 801–807.
116. Nichols W. W. // Am. J. Hypertens. – 2005. – **18**, N 1, Pt2. – P. 3S–10S.
117. Bhoday J., de Silva S., Xu Q. // Curr. Vasc. Pharmacol. – 2006. – **4**. – P. 269–275.
118. Парфенова Е. В., Ткачук В. А. // Вопросы мед. химии. – 2000. – **46**, № 3. – С. 293–310.
119. Strauss B. H., Lau H. K., Bowman K. A. et al. // Circulation. – 1999. – **100**, N 15. – P. 1616–1622.
120. Ткачук В. А., Бибилашвили Р.Ш., Плеханова О. С. и др. / Сб. трудов к 80-летию академика Е. И. Чазова. «Сердечно-сосудистая патология. Современное состояние проблемы». – М.: Медиа-Медика, 2009. – 364 с.
121. Krasnikova T. L., Parfyonova Y. V., Alekseeva I. A. et al. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 1999. – **26**, N 4. – P. 354–357.
122. Соломатина М. А., Плеханова О. С., Ильинская О. П. и др. // Цитология. – 2004. – **46**, № 4. – С.352–360.

123. *Falkenberg M., Tom C., DeYoung M. B. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – 99, N 16. – P. 10665–10670.*
124. *Kienast J., Padry T., Steins M. et al. // Thromb. Haemost. – 1998. – 79, N 3. – P. 579–586.*
125. *Cozen A. E., Moriwaki H., Kremen M. et al. // Circulation. – 2004. – 109, N 17. – P. 2129–2135.*
126. *Saksela O., Rifkin D. B. // J. Cell Biol. – 1990. – 110, N 3. – P. 767–775.*
127. *Hildenbrand R., Jansen C., Wolf G. et al. // Lab. Invest. – 1998. – 78, N 1. – P. 59–71.*
128. *Ikeda U. // Curr. Vasc. Pharmacol. – 2003. – 1, N 1. – P. 65–70.*
129. *Nakatani M., Takeyama Y., Shibata M. et al. // Cardiovasc. Pathol. – 2003. – 12, N 1. – P. 40–48.*
130. *Плеханова О. С., Соломатина М. А., Ратнер Е. И. и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2008. – 145, № 1. – P. 15–20.*
131. *Khalil A. A., Hall J. C., Aziz F. A. et al. // ANZ. J. Surg. – 2006. – 76, N 11. – P. 1010–1016.*
132. *Plekhanova O., Parfyonova Y., Bibilashvily R. et al. // Atherosclerosis. – 2001. – 159. – P. 297–306.*
133. *Korshunov V. A., Solomatina M. A., Plekhanova O. S. et al. // J. Vasc. Res. – 2004. – 41. – P. 481–490.*
134. *Plekhanova O. S., Parfyonova Y. V., Bibilashvily R. et al. // J. Hypertens. – 2000. – 18. – P. 1065–1069.*
135. *Парфенова Е. В., Плеханова О. С., Калинина Н. И. и др. // Кардиология. – 2000. – 9. – С. 69–77.*
136. *Плеханова О. С., Калинина Н. И., Волынская Е. А. и др. // Рос. физиол. журн. – 2000. – 86, № 1. – С. 18–27.*
137. *Carmeliet P., Moons L., Herbert J. M. // Circ.Res. – 1997. – 81. – P. 829–839.*
138. *Kenagy R. D., Vergel S., Mattsson E. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1996. – 16. – P. 1373–1382.*
139. *Carmeliet P., Moons L., Dewerchin M. // J. Cell Biol. – 1998. – 140. – P. 233–245.*
140. *Parfyonova Y., Plekhanova O., Solomatina M. et al. // J. Vasc. Res. – 2004. – 41. – P. 268–276.*
141. *Lansky A. J., Mintz G. S., Popma J. J. // J. Am. Coll. Cardiol. – 1998. – 32. – P. 329–337.*
142. *Plekhanova O. S., Stepanova V. V., Ratner E. I. et al. // J. Vasc. Res. – 2006. – 43. – P. 437–446.*
143. *Collen D. // Thromb. Haemost. – 1999. – 82, N 2. – P. 259–270.*
144. *Lijnen H. R., Van Hoef B., Lupu F. et al. // Arterioscler. Throm. Vasc. Biol. – 1998. – 18, N 7. – P. 1035–1045.*
145. *Mason D. P., Kenagy R. D., Hasenstab D. et al. // Circ. Res. – 1999. – 85, N 12. – P. 1179–1185.*
146. *Forough R., Lea H., Starcher B. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 1998. – 18, N 5. – P. 803–807.*
147. *Prescott M. F., Sawyer W. K., Von Linden-Reed J. et al. // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1999. – 878. – P. 179–190.*

148. Keski-Oja J., Lohi J., Tuuttila A. et al. // Exp.Cell Res. – 1992. – **202**. – P. 471–476.
149. Плеханова О. С., Соломатина М. А., Меньшиков М. Ю. и др. // Кардиология. – 2006. – **46**, № 9. – С. 47–56.
150. Plekhanova O. S., Parfyonova Ye. V., Bashtrykov P. P. et al. // J. Vasc. Res. – 2008. – **46**, N 3. – P. 177–187.
151. Abe J., Berk B. C. // Trends Cardiovasc. Med. – 1998. – **8**. – P. 59–64.
152. Berk B. C. // Physiol. Rev. – 2001. – **81**. – P. 999–1030.
153. Sheehan A. L., Carrell S., Johnson B. et al. // Atherosclerosis. – 2011. – **216**, N 2. – P. 321–326.
154. Плеханова О. С., Меньшиков М. Ю., Баитрыков П. П. и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2006. – **142**, № 1. – С. 304–307.
155. Парфенова Е. В., Ткачук В. А. // Кардиол. вестник. – 2007. – **2**. – С. 5–15.
156. Lamalice L., Le Voeuf F., Huot J. // Circ. Res. – 2007. – **100**, N 6. – P. 782–794.
157. van Weel V., van Tongeren R. B., van Hinsbergh V. W. et al. // Ann. Vasc. Surg. – 2008. – **22**. – P. 582–597.
158. Gualandris A., Lopez C. T., Giunciuglio D. // Microvasc. Res. – 1997. – **53**. – P. 254–260.
159. Duffy M. J., Maguire T. M., McDermott E. W. et al. // J. Surg. Oncol. – 1999. – P. 130–135.
160. Arras M., Ito W.D., Scholz D. et al. // J. Clin. Invest – 1998. – **101**. – P. 40–50.
161. Heil M., Ziegelhoeffer T., Pipp F. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2002. – **283**. – P. H2411–H2419.
162. Deindl E., Ziegelhoeffer T., Kanse S. M. // FASEB J. – 2003. – **17**. – P. 1174–1176.
163. Basire A. // Thromb. Haemost. – 2006. – **95**, N 4. – P. 678–688.
164. Traktuev D. O., Tsokolaeva Z. I., Shevelev A. A. et al. // Mol. Ther. – 2007. – **15**, N 11. – P. 1939–1946.
165. Kroon M. // Am. J. Pathol. – 1999. – **154**, N 6. – P. 1731–1742.
166. Heymans S., Lutun A., Nuyens D. et al. // Nat Med. – 1999. – **5**, N 10. – P. 1135–1142.
167. Ferrara N. // Endocr. Rev. – 2004. – **25**, N 4. – P. 581–611.
168. Colombo E. S., Menicucc G., McGuire P. G. et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2007. – **48**, N 4. – P. 1793–1800.
169. Парфенова Е. В., Цоколаева З. И., Трактуев Д. О. и др. // Мол. мед. – 2006. – **2**. – С. 10–23.
170. Franco P., Vocca I., Carriero M. V. et al. // J. Cell Sci. – 2006. – **119**, Pt 16. – P. 3424–3434.
171. Franco P., Carotenuto A., Marcozzi C. et al. // Chembiochem. – 2013. – **14**, N 7. – P. 882–889.
172. Kim K., Hong Y., Lee Y. et al. // Exp. Mol. Med. – 2003. – **35**, N 6. – P. 578–585.

**IDENTIFICATION OF TUDOR DOMAIN
CONTAINING 7 PROTEIN AS A NOVEL PARTNER
AND A SUBSTRATE FOR RIBOSOMAL PROTEIN
S6 KINASES – S6K1 AND S6K2**

Oleksandr SKOROKHOD^{1,3}, Ganna PANASYUK¹, Ivan NEMAZANYYY¹,
Ivan GOUT^{1,2}, Valeriy FILONENKO^{1,3}

¹*Department of Cell Signalling, Institute of Molecular Biology and
Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

²*Department of Structural and Molecular Biology,
University College London, United Kingdom;*

³*The State Key Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Kyiv, Ukraine;
e-mail: filonenko@imbg.org.ua*

Ribosomal protein S6 kinases (S6Ks) are principal regulators of cell size, growth and metabolism. Signaling via the PI3K/mTOR pathway mediates the activation of S6Ks in response to various mitogenic stimuli, nutrients and stresses. To date, the regulation and cellular functions of S6Ks are not fully understood. Our aim was to investigate and characterize the interaction of S6Ks with the novel binding partner of S6Ks, Tudor domain containing 7 protein (TDRD7), which is a scaffold protein detected in complexes involved in the regulation of cytoskeleton dynamics, mRNA transport and translation, non-coding piRNAs processing and transposons silencing. This interaction was initially detected in the yeast two-hybrid screening of HeLa cDNA library and further confirmed by pull-down and co-immunoprecipitation assays. In addition we demonstrated that TDRD7 can form a complex with other isoform of S6K - S6K2. Notably, both isoforms of S6K were found to phosphorylate TDRD7 in vitro at multiple phosphorylation sites. Altogether, these findings demonstrate that TDRD7 is a novel substrate of S6Ks, suggesting the involvement of S6K signaling in the regulation of TDRD7 cellular functions.

Ribosomal protein S6 kinases (S6Ks) belong to the AGC family of Ser/Thr kinases and are implicated in the regulation of cell size, growth and metabolism. Mammalian cells express two isoforms of the kinase, S6K1 and S6K2, which are encoded by different genes (RPS6KB1 and RPS6KB2, respectively) [1–5]. Both genes encode short and long splicing isoforms of S6Ks via the use of alternative translational start sites [1]. The predominant short (70 kDa) isoform of S6K1 is localized mainly, but not exclusively, within the cytoplasm, while a nuclear localisation sequence (NLS) found within the N-terminal (23 aa.) extension of long S6K1 isoform (85 kDa) may target it to the nucleus [1, 2]. Similarly, the long (56kDa) isoform of S6K2 differs from the short (54 kDa) splicing version by the presence of the NLS [3, 4] located within the N-

terminal (13 aa.) extension. At the same time, both S6K2 isoforms contain an additional NLS at the C-terminus, which determines their predominant nuclear localization in quiescent cells [5].

Deficiency of both S6Ks is associated with a profound decrease in cell viability [6]. The observed phenotype can be rescued by the expression of either S6K isoform. The activity of S6 kinases is regulated by phosphorylation/dephosphorylation events in response to various extracellular stimuli [7, 8]. Treatment of cells with growth factors, cytokines and hormones leads to a rapid activation of S6Ks, while growth inhibitory agents, such as steroids and TGF β , suppress their activities. Signalling via the PI3K and mTOR pathways, induced by growth factors or nutrients respectively, are the key events in the activation process of S6Ks [9–11].

At present, more than twenty known substrates have been described for S6Ks, but only few of them have well defined functional consequences [12].

A number of S6K-binding partners have been implicated in regulating its kinase activity, including small GTPases Rac1 and cdc42, protein kinases PDK1 and PKC γ , protein phosphatases PP2A and PP1 and cytoskeletal protein neurabin [8, 12–14].

Here, we report the identification of a novel S6K1/2 binding partner, Tudor domain containing 7 protein (TDRD7), which is known as a scaffold protein with molecular weight of approximately 130 kDa. TDRD7 was originally identified as a binding partner of Ser/Thr PCTAIRE2 kinase [15]. Further investigations have led to the discovery of TDRD7 in a complex with ik3/Cables – cyclin-dependent kinase binding protein [16].

TDRD7 is localized on the periphery of mitochondria and together with other members of tudor-family (TDRD1/MTR-1, TDRD6) has been implicated in the formation of polar/germinal granules (nuage), which contain Dicer and microRNAs. These structures are involved in the microRNA pathway and the formation of a ribonucleoprotein complex in spermatids [15, 17–19].

Other research groups suggested the involvement of TDRD7 in the complex with TACC1-chTOG-Aurora kinase A, which controls mRNA fate in conjunction with microtubule organization and the maintenance of cell polarity [20].

TDRD7 contain several unique domains in its structure. In particular, there are three LOTUS domains at the N terminus, which are associated with small RNA pathways in the germline [21]. A distinctive feature of TDRD7 is the presence of Tudor domains (Tudor 1 (460-582aa), Tudor 2 (649-776aa) and Tudor 3 (909-1027aa)). It is a large conserved domain, initially described in proteins associated with nucleic acids [22, 23]. Recent studies demonstrated that Tudor domains are specialized in the recognition

of methylated lysine or methylated arginine sites, and are involved in chromatin remodelling (through histones dimethylation and RNA processing) [22–24]. Moreover, Tudor domain-containing proteins were shown to have chaperone-like activity, especially in the process of macromolecular complex formation [18, 22, 24–27].

In this study, we describe for the first time regulatory complexes between ribosomal protein S6 kinases (S6K1 and S6K2) and TDRD7. Specific phosphorylation of TDRD7 by both isoforms of S6K has been demonstrated *in vitro*, but the functional consequence of the TDRD7-S6K1 and TDRD7-S6K2 association in mammalian cells remains to be investigated.

Materials and Methods

Production and purification of fusion proteins. Full-length coding sequence of TDRD7 and several cDNA fragments (F1 (1-290 aa); F2 (181-411 aa); F3 (381-620 aa); F5 (620-873 aa); F6 (860-1098 aa) were amplified by PCR using specific oligonucleotides. Amplified cDNA fragments were purified and cloned into pET30a vector (Novagen) in frame with the N-terminal and C-terminal 6His-tags. The expression of 6His-fusion recombinant proteins was performed in BL21 DE3 *E. coli* strain by induction with IPTG for 3 h at 30 °C. Recombinant His-TDRD7 fusion proteins were affinity purified on TALON resin (BD-Clontech, USA) from soluble fractions according to the manufacturer's recommendations. The quality of purified fusion proteins was analysed by SDS-PAGE.

EE-S6K1 and S6K2 proteins were purified from insect cells infected with recombinant S6K1 or S6K2 baculoviruses as previously described [14].

Reagents, antibodies and cell culture. Generation of anti-TDRD7 mAbs (specific to 181-411aa sequence), anti-S6K2 mAbs (2B) (specific to the N-terminal region of S6K2) and anti-S6K1 polyclonal antibodies (specific to the C-terminal region of S6K1) has been described previously [28–30]. Anti-His antibodies were purchased from Santa Cruz.

Human embryonic kidney cells HEK293 (obtained from ATCC) were maintained at 37 °C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Inc.), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin.

TDRD7-S6K1 pull-down assay. 0.1 µg of 6His-tag TDRD7 fusion proteins were incubated with HisLink resin (Promega) for 1 h at 4 °C in lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, and a mixture of protease inhibitors (Roche Molecular Diagnostics, Meylan, France). The beads were then washed three times and incubated at 4 °C for 3 h in the same buffer with 50 ng of baculovirally produced EE-S6K1 protein obtained previously [31] (Panasnyuk et al., 2006). Bound proteins were eluted by boiling in Laemmli

sample buffer, resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and detected by immunoblotting with anti-S6K1 polyclonal antibodies.

Immunoprecipitation. Supernatants of HEK 293 cells were prepared from total lysate and subjected to immunoprecipitation using appropriate antibodies and protein A-Sepharose beads (Amersham). Briefly, 1 µg of mAbs in a total volume of 1 mL was incubated at 4 °C for 3h with supernatants, containing 500 µg of total cellular protein and 15 µL of 50% slurry of protein A-Sepharose preliminary washed with lysis buffer. Then, beads were washed three times with 1mL of lysis buffer and boiled for 5 min in Laemmli sample buffer.

Immunoblot analysis. Immune complexes or total cell lysates were separated by SDS-PAGE. Resolved proteins were electroblotted onto PVDF membrane and treated with appropriate antibodies as described previously [28]. The antigen-antibody complexes were detected using the ECL system (Millipore).

Far-Western blot analysis. EE-S6K1 (0.4 µg/line) was resolved by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. The membrane was blocked with 2% BSA in TBS buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) for 1 h at 4 °C. Membrane strips were incubated in TBS buffer for 14 h at 4 °C with one of the recombinant TDRD7 peptides (F1, F2 or F6) diluted to 1 µg/ml or GST as a control. After washing three times with TBS-T (TBS buffer with 1% Tween 20), strips were incubated with anti-His antibodies for 1 h at 4 °C in TBS buffer, washed three times with TBS-T and incubated with anti-rabbit secondary antibodies in 1 : 5000 dilution (Promega, USA) for 1 h at 4 °C. Alternatively, strips were incubated with anti-S6K1 antibodies according to the procedure described above. Finally, the antigen-antibody complexes were detected using the ECL system (Millipore).

In vitro kinase assay. 0.1 µg of recombinant EE-S6K1 or EE-S6K2 was incubated with 10 µCi [γ -³²P] ATP and 0.2 µg of purified TDRD7 proteins as substrates in 30 µl of kinase assay buffer (10 mM MOPS, pH 7.2, 5 mM β-glycerophosphate, 0.5 mM EGTA, 10 mM MgCl₂ and 0.5 mM DTT). GST protein (Abcam) was used as a negative control for S6Ks. We used myelin basic protein (MBP) from Millipore to test the activity of S6Ks, as it is commonly used as a substrate for determining the activity of protein kinases *in vitro* [32, 33].

The reactions were carried out at 30 °C for 1 hour and stopped by adding Laemmli sample buffer. Protein complexes were separated by SDS-PAGE, and phosphorylation of substrates was visualized by autoradiography, using Agfa X-ray films.

Results

The yeast twohybrid screen of a HeLa cDNA library with S6K1 as a bait allowed us to identify a number of known and novel binding partners [34]. Among them, 17 cDNA clones contained full-length coding sequence for TDRD7 protein. Notably, all cDNAs had 5' non-coding sequences of various lengths and therefore originated from different mRNAs. The interaction of wild type S6K1 with TDRD7 in yeast cells was also confirmed in mating assay [34]. In this study, we focused on examining the specificity of TDRD7/S6Ks interaction *in vitro* and in mammalian cells, and on testing TDRD7 as a substrate for S6K1 and 2.

S6K1 interacts with TDRD7 in vitro. To confirm the interaction between S6K1 and TDRD7, recombinant proteins were used in *in vitro* binding assays. The EE-tagged S6K1 was generated using baculovirus expression system and assessed for its capability to interact with a panel of His-TDRD7 fusion proteins bound to the HisLink resin (see Materials and methods). The specificity of interaction between His-TDRD7 proteins and S6K1 was analysed by immunoblotting with anti-S6K1 antibodies. As shown in Fig. 1A, specific interaction was only observed between EE-S6K1 and the F6 fusion protein, corresponding to the C-terminal region of TDRD7.

Furthermore, we confirmed the interaction between EE-S6K1 and the C-terminal region of TDRD7 by Far-Western blot analysis. As Fig. 1B shows, the C-terminal fragment of TDRD7 interacts specifically with EE-S6K1 and this interaction is possibly mediated via the Tudor domains.

TDRD7 forms a complex with S6K1 in vivo. The association of S6K1 with the C-terminal fragment of TDRD7 in a pull-down assay and Far-Western blot encouraged us to test the interaction between endogenous S6K1 and TDRD7 in HEK 293 cells. For this purpose, we analyzed TDRD7 complexes immunoprecipitated from HEK 293 cell lysate using anti-TDRD7 mAbs [28]. The presence of S6K1 in the immune complex was detected by specific anti-S6K1 antibodies. As shown in Fig. 1C, S6K1 forms specific complex with TDRD7 in HEK293 cells. In a control experiment, we coupled anti-GFP mAbs to beads and probed them with cell lysates. No binding of endogenous S6K1 with anti-GFP beads was detected in this analysis.

S6K2 interacts with TDRD7 in HEK293 cells. Our finding of the TDRD7/S6K1 complex in mammalian cells, prompted us to investigate whether TDRD7 has the potential to interact with the second S6K isoform, S6K2. Endogenous S6K2 was immunoprecipitated with anti-S6K2 mAbs (2B) specific to the N-terminal regulatory region and the immune complexes probed in Western blotting with anti-TDRD7 mAbs. The data

presented in Fig. 2 clearly indicate that TDRD7 is specifically co-immunoprecipitated from HEK293 cell lysate with S6K2.

Both S6K isoforms phosphorylate TDRD7 in vitro. To address functional consequences of the TDRD7-S6K1 and TDRD7-S6K2 interactions in mammalian cells, we examined whether S6K1 or/and S6K2 can phosphorylate TDRD7 *in vitro*. Initially we performed a bioinformatic analysis of TDRD7 amino acid sequence for the presence of potential S6K1 or S6K2 phosphorylation sites, using different online resources, including PhosphoNET (www.phosphonet.ca), HPRD (www.hprd.org), PSP (www.phosphosite.org), PPSP (<http://ppsp.biocuckoo.org>) [32, 35–37].

Bioinformatic analysis revealed the presence of several potential phosphorylation sites for S6Ks in TDRD7. Notably, some of these phosphorylation motifs were located in F1, F2, F5 and F6 TDRD7 constructs (Fig. 3A). In total, the analysis revealed five potential sites for S6 kinase phosphorylation (according to the highest predicted score) within the TDRD7 sequence. Two of them (Ser35 and Ser92) are located within the F1 fragment, one (Ser319) in F2, two (Thr837 and Ser862) in F5 fragment and one (Ser862) in the C-terminal F6 fragment. The highest probability was for Ser319 and Ser862, mapped to peptides F2 and F6, respectively (Fig. 3A).

To verify the bioinformatic prediction, we performed an *in vitro* S6K1 and S6K2 kinase assay using as a substrate different His-TDRD7 fusion proteins. The data presented in Fig. 3C clearly indicate that both S6K1 and S6K2 readily phosphorylate F2, F5 and F6 proteins. No phosphorylation of F1 and F3 was detected in several independent experiments. High level of S6K1 and S6K2 autophosphorylation in this assay indicated the use of highly active recombinant S6Ks.

Discussion

In summary, our results demonstrate for the first time that both S6K1 and S6K2 directly interact with TDRD7 protein *in vitro* and in mammalian cells. In addition, bioinformatic analysis revealed the existence of several S6K1 and S6K2 phosphorylation sites in TDRD7 (presumably Ser319, Thr837 and Ser862). Phosphorylation of TDRD7 by recombinant S6K1/2 was confirmed in *in vitro* kinase assay.

The functional consequence of TDRD7-S6K1 and TDRD7-S6K2 interactions in cells is intriguing and remains to be answered. Although the role of TDRD7 in cell is still insufficiently studied, nevertheless this protein is of a great interest due to its presence in complexes that are involved in the regulation of gene silencing, small non-coding mRNA processing, mRNA transport and translation, microtubule dynamics and centrosomal organization [13, 15]. The above data allow us to speculate that S6Ks may

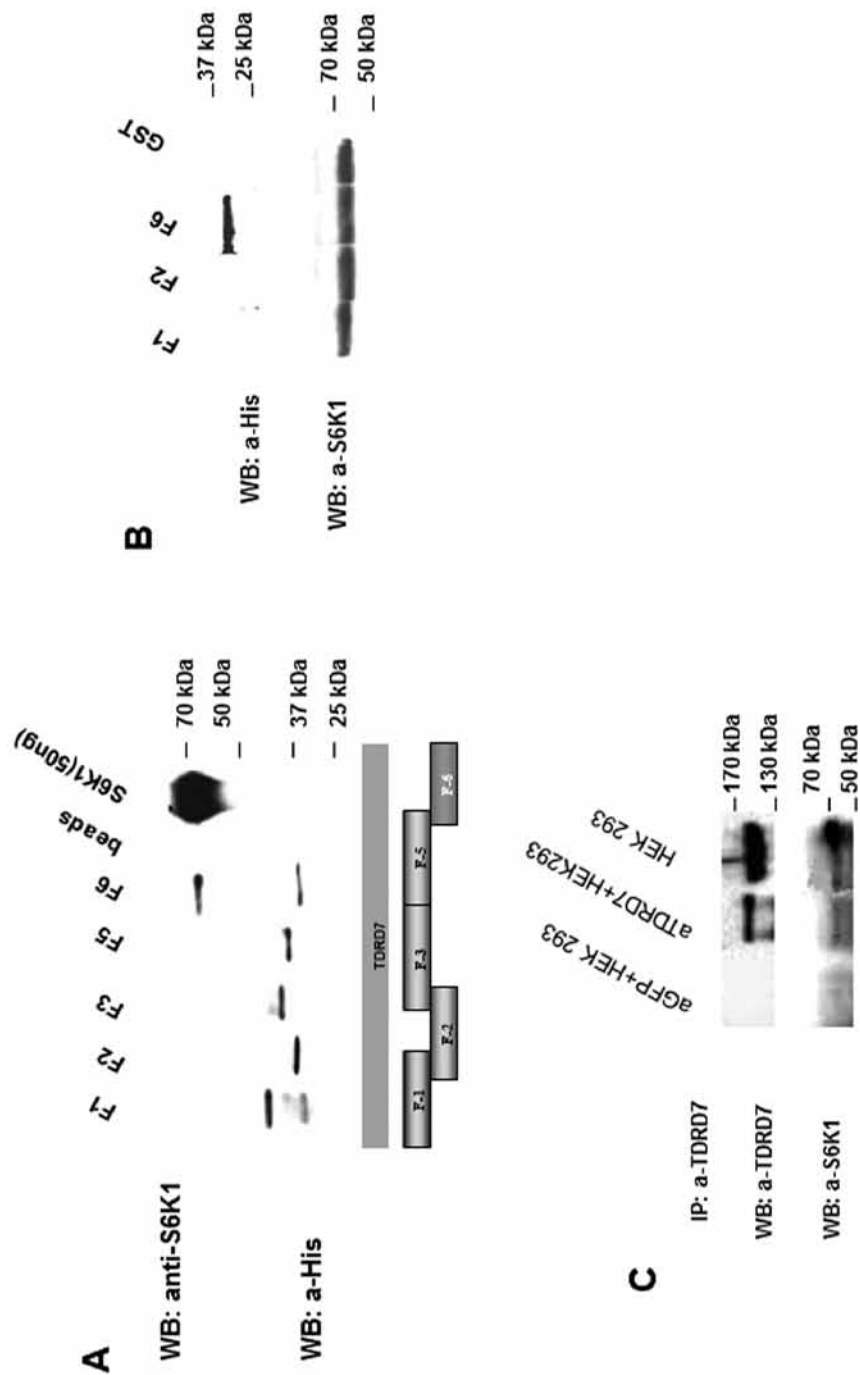


Fig. 1. *In vitro* and *in vivo* association between S6K1 and TDRD7. **A** – S6K1 interacts with C-terminal fragment of TDRD7(F6) in pull-down assay. **B** – S6K1 interacts with C-terminal fragment of TDRD7 in Far-Western blot. **C** – S6K1 is co-immunoprecipitated with TDRD7 in HEK293 cell lysate

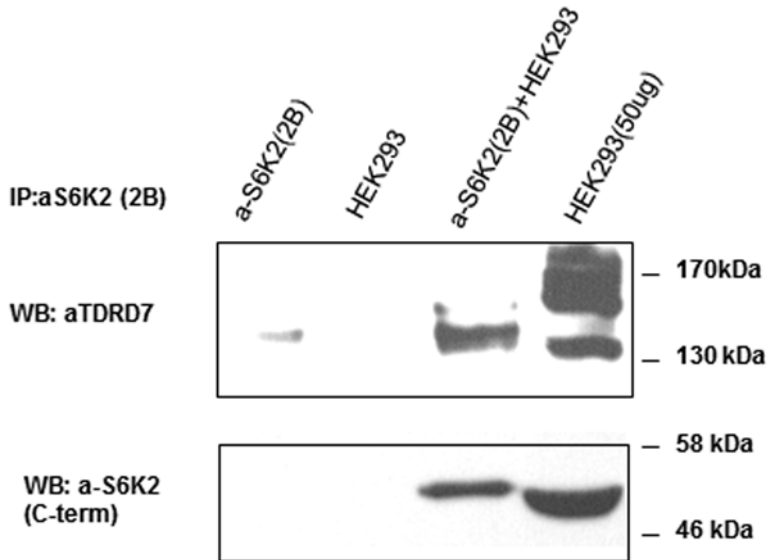


Fig. 2. In vivo association between S6K2 and TDRD7. S6K2 was immunoprecipitated from cell lysates with anti-S6K2 (2B) mAbs. The immune complexes were eluted by boiling in Laemmli sample buffer, resolved by SDS-PAGE and analysed by anti-TDRD7 mAbs and anti-S6K2 C-terminal polyclonal antibodies. Beads incubated with anti-S6K2 (2B) or HEK 293 lysate along were used to test the specificity of co-immunoprecipitation

influence TDRD7 adaptor functions through site-specific phosphorylations, which can drive the formation of regulatory complexes, consisting of signalling proteins and RNAs.

Subcellular localization of TDRD7/S6K1 and TDRD7/S6K2 complexes is another interesting question which remains to be examined. It has been previously reported that TDRD7 is localized to P-bodies and so-called germinal granules (for germ cells), which are mainly detected in close proximity to mitochondrial and nuclear membranes. Notably, TDRD7 was also detected in cytoplasmic structures of unknown functions [18]. It was speculated that these cytosolic structures may contain the TACC-chTOG-PCTAIRE-TDRD7 complexes, involved in mRNA transport and the regulation of translation [20]. We can not exclude that the phosphorylation of TDRD7 by S6K1 or/and S6K2 may influence TDRD7 association with other proteins/RNAs and its subcellular localization. Taking into account that S6K1 and S6K2 possess NLS-motifs, the interaction with TDRD7 also may be important for the regulation of S6K1 and/or S6K2 nucleocytoplasmic shuttling.

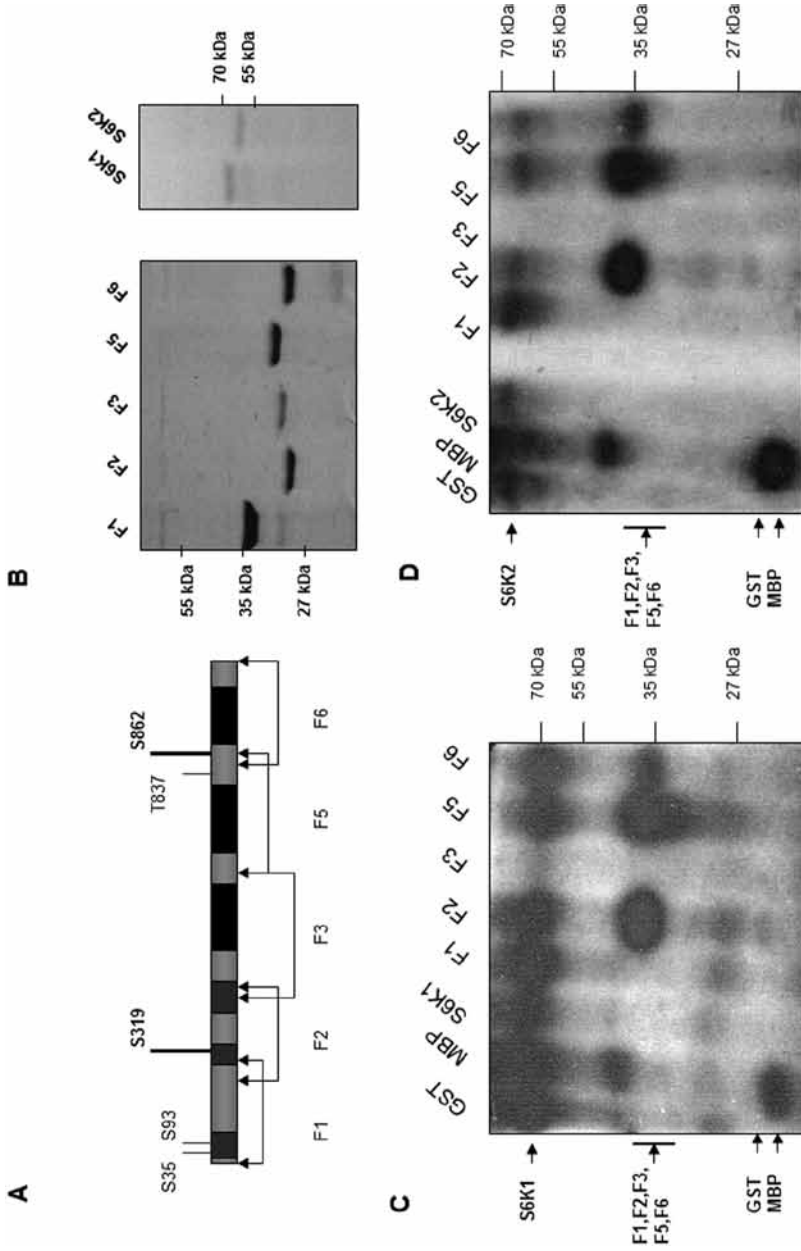


Fig. 3. S6K1 and S6K2 specifically phosphorylates TDRD7 fragments *in vitro*. **A** – Bioinformatical analysis of TDRD7 structure, with an indication of potential S6K phosphorylation sites. **B** – SDS-PAGE analysis of purified recombinant peptides (0,2 μg/lane) of TDRD7 (left panel) and recombinant S6K1 (1 μg/lane) and S6K2 (1 μg/lane) (right panel) used for *in vitro* kinase reaction. **C** – *In vitro* phosphorylation of TDRD7 fragments by S6K1. **D** – *In vitro* phosphorylation of TDRD7 fragments by S6K2

Therefore, further investigation of the TDRD7-S6K1 and TDRD7-S6K2 functional complexes in cells could shed light on many hidden aspects of S6Ks signalling within the cell.

This work was supported by the National Academy of Sciences of Ukraine, the State Fond of Fundamental Research of Ukraine (grant №F46/457-2011) and FEBS summer fellowship.

Acknowledgments

The authors thank Oksana Breus for her assistance on this project.

References

1. Grove J., Banerjee P., Balasubramanyam A. et al. Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini // *Mol. Cell Biol.* – 1991. – **11**. – P. 5541–5550.
2. Saitoh M., Dijke P., Miyazono K., Ichijo H. Cloning and characterization of p70(S6K beta) defines a novel family of p70 S6 kinases // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – **253**. – P. 470–476.
3. Jeno P., Ballou L., Novak-Hofer I., Thomas G. Identification and characterization of a mitogenic-activated S6 kinase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – **85**. – P. 406–410.
4. Gout I., Minami T., Hara K. et al. Molecular cloning and characterization of a novel p70 S6 kinase, p70 S6 kinase beta containing a proline-rich region // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**. – P. 30061–30064.
5. Koh H., Jee K., Lee B. et al. Cloning and characterization of a nuclear S6 kinase. S6 kinase-related kinase (SRK); a novel nuclear target of Akt // *Oncogene.* – 1999. – **18**. – P. 5115–5119.
6. Pende M., Um S., Mieulet V. et al. S6K1K/K/S6K2K/K mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 50-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway // *Mol. Cell Biol.* – 2004. – **24**. – P. 3112–3124.
7. Shima H., Pende M., Chen Y. et al. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase // *EMBO J.* – 1998. – **17**. – P. 6649–6659.
8. Andres J., Johansen J., Maller J. Identification of protein phosphatases 1 and 2B as ribosomal protein S6 phosphatases in vitro and in vivo // *J. Biol. Chem.* – 1987. – **262**. – P. 14389–14393.
9. Avruch J., Belham C., Weng Q. et al. The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* – 2001. – **26**. – P. 115–154.
10. Ruvinsky I., Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size // *Trends. Biochem. Sci.* – 2006. – **31**. – P. 342–348.
11. Giraud J., Leshan R., Lee Y., White M. Nutrient-dependent and insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine 302 correlates with increased insulin signaling // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 3447–3454.

12. *Fenton T., Gout I.* Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2011. – **43**. – P. 47–59.
13. *Thomas G.* The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth // *Biol. Res.* – 2002. – **35**. – P. 305–313.
14. *Valovka T., Verdier F., Cramer R. et al.* Protein kinase C phosphorylates ribosomal protein S6 kinase β and regulates its subcellular localization // *Mol. Cell Biol.* – 2003. – **23**. – P. 852–863.
15. *Hirose T., Kawabuchi M., Tamaru T. et al.* Identification of tudor repeat associator with PCTAIRE 2 (Trap). A novel protein that interacts with the N-terminal domain of PCTAIRE 2 in rat brain // *Eur. J. Biochem* – 2000. – **267**. – P. 2113–2121.
16. *Yamochi T., Nishimoto I., Tsukasa O., Matsuoka M.* ik3-1/Cables Is Associated with Trap and Pctaire2 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – **286**. – P. 1045–1050.
17. *Chuma S., Hosokawa M., Kitamura K. et al.* Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103**. – P. 15894–15899.
18. *Hosokawa M., Shoji M., Kitamura K. et al.* Tudor-related proteins TDRD1/MTR-1, TDRD6 and TDRD7/TRAP: Domain composition, intracellular localization, and function in male germ cells in mice // *Dev. Biol.* – 2007. – **301**. – P. 38–52.
19. *Kotaja N., Bhattacharyya S., Jaskiewicz L. et al.* The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103**. – P. 2647–2652.
20. *Conte N., Delaval B., Ginestier C. et al.* TACC1–chTOG–Aurora A protein complex in breast cancer // *Oncogene.* – 2003. – **22**. – P. 8102–8116.
21. *Callebaut I., Mornon J. P.* LOTUS, a new domain associated with small RNA pathways in the germline // *Bioinformatics.* – 2010. – **26**. – P. 1140–1144.
22. *Selenko P., Sprangers R., Stier G. et al.* SMN Tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. – **8**. – P. 27–31.
23. *Amikura R., Hanyu K., Kashikawa M., Kobayashi S.* Tudor protein is essential for the localization of mitochondrial RNAs in polar granules of *Drosophila* embryos // *Mech. Dev.* – 2001. – **107**. – P. 97–104.
24. *Huyen Y., Zgheib O.* Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks // *Nature.* – 2004. – **432**. – P. 406–411.
25. *Jin J., Xie X., Chen C. et al.* Eukaryotic protein domains as functional units of cellular evolution // *Sci. Signal.* – 2009. – **2**. – P. 1–19.
26. *Cote J., Richard S.* Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**. – P. 28476–28483.
27. *Thomson T., Lasko P.* Tudor and its domains: germ cell formation from a tudor perspective. // *Cell Res.* – 2005. – **15**. – P. 281–291.
28. *Skorokhod O., Nemazanyy I., Breus O. et al.* Generation and characterization of monoclonal antibodies to TDRD7 protein // *Hybridoma (Larchmt).* – 2008. – **27**. – P. 211–216.

29. Valovka T., Filonenko V., Velykyi M. et al. Features of fibronectin-dependent activation of ribosomal protein S6 kinase (S6K1 and S6K2) // Ukr. Biokhim. Zh. – 2000. – **72**. – P. 31–37.
30. Savinska L., Skorokhod O., Klipa O. et al. Development of Monoclonal Antibodies Specific to Ribosomal Protein S6 Kinase 2 // Hybridoma (Larchmt). – 2012. – **31**. – P. 289–294.
31. Panasyuk G., Nemazanyy I., Zhyvoloup A. et al. Nuclear Export of S6K1 II Is Regulated by Protein Kinase CK2 Phosphorylation at Ser-17 // J. Biol. Chem. – 2006. – **281**. – P. 31188–31201.
32. *PhosphoNET*: Human phosphosite knowledge base (PhosphoNET ID IPI00478741).
33. Chevalier D., Allen B. G. Purification of myelin basic protein from bovine brain. // Protein Expr Purif. – 2000. – **18**. – P. 229–234.
34. Panasyuk G., Nemzanyy I., Zhyvoloup A. et al. The beta subunit of casein kinase 2 as a novel binding partner of the ribosomal protein S6 kinase 1 // Biopolym Cell. – 2005. – **21**. – P. 5407–5412.
35. *HPRD*: Human protein reference database (HPRD ID 11626).
36. *PPSP*: Prediction of PK-Specific Phosphorylation Site.
37. *PSP*: PhosphoSitePlus (PhosphoSitePlus ID Q8NHU6).

ИММУНОСУПРЕССИЯ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ И РИСКИ ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

О. И. КИСЕЛЕВ

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития РФ, С.-Петербург

Издание, в котором предполагается публикация этой статьи, посвящено Юбилею нашего выдающегося коллеги академику Национальной академии наук Украины С. В. Комисаренко. Для нас, его коллег, он безусловно относится к числу известных ученых, деятельность которого распространяется от масштабов Национальной академии до работы дипломата, до гражданина Украины, внесшего вклад в развитие и становление новейшей истории Украины. Искренне радуется национальный спрос на такую личность, определяемый, вероятно, и предшествующей биографией выдающегося ученого и заинтересованностью в формировании личностей национального и международного масштаба.

С. В. Комисаренко — биохимик, наш коллега. Поэтому я долго думал над тем, какой материал направить в Юбилейное издание, что может быть наиболее интересным и заметным сейчас и не устареет в ближайшие годы. Я выбрал проблему, в которой сочетаются самые выдающиеся достижения современной биохимии и молекулярной биологии. При этом она невероятно близка с практическим вопросам здравоохранения и нашей жизни. Проблему, которая была бы от нас далекой, если бы не была бы завершена программа «Геном человека» и не состоялось бы открытие важнейших функций эндогенных ретровирусов, внедрившихся в геном человека более 25 млн. лет назад. И, конечно, эта проблема захватывает своим драматизмом, так как роль эндогенных вирусов оказалась важной не только в нашем происхождении и рождении, так как с этими вирусами связаны многие риски развития основных видов патологии человека: от бесплодия до болезней беременности, от риска развития злокачественных заболеваний до системной патологии и аутоиммунных процессов. И, главное, что следует из понимания роли эндогенных вирусов в нашем геноме, это высокий риск вирусных заболеваний при беременности. Решение этой проблемы в значительной степени заслуга двух направлений науки — современной биохимии и молекулярной биологии:

- 1. Изучение строения генома человека.*
- 2. Расшифровка строения и функций иммунорецепторов.*

Поэтому мой выбор остановился на следующих загадках беременности:

— каким образом обеспечивается иммунная привилегия плода и развитие толерантности;

- какие механизмы лежат в основе функциональной иммуносупрессии при беременности;
- почему инфекции представляют особую опасность для беременных женщин;
- существует ли код контроля иммунной системы и пользуются ли этим кодом вирусы?

На эти вопросы невозможно было бы ответить и изучать их в дальнейшем без фундаментальных методов и знаний биохимии, молекулярной биологии, рентгеноструктурного анализа пространственной структуры белков, геномных исследований, то есть всего того, что составляет основу работы современных биохимиков и нашего уважаемого юбиляра академика НАН Украины С. В. Комисаренко.

После пандемии гонконгского гриппа 1968/69 гг. отношение к гриппу вновь постепенно стало изменяться как к опасной для жизни инфекции [1–4].

Впервые за многие годы заболеваемость гриппом в самом начале пандемии 2009 г. быстро распространялась среди молодых людей, не составили исключение и женщины детородного возраста. Госпитализация беременных женщин во многих странах и регионах России носила массовый характер [1]. Несмотря на относительно невысокий уровень распространения гриппа птиц H5N1, уже в период с 2005 по 2008 г. начали регистрироваться осложненные случаи болезни среди беременных женщин [2].

Тяжелое течение пандемического гриппа H1N1pdm09 у беременных женщин обратило на себя особое внимание. Во многих случаях заболеваемости гриппом у беременных возникла необходимость в оказании помощи в палатах интенсивной терапии. В ущерб от пандемии 2009/11 гг. гибель беременных женщин от гриппа является самым значительным и драматическим событием, сравнимым с описанием таких же явлений в период «испанки» 1918 года [1, 5, 6].

Вместе с тем, выявилось и очевидное отставание в понимании природы многих процессов, сопутствующих беременности [6–8]. В первую очередь это относится к функциональной иммуносупрессии, обеспечивающей контроль за вынашиванием плода без иммунологического конфликта. Оказалось, что иммуносупрессивный барьер между полуаллогенным плодом и иммунной системой материнского организма обеспечивается ключевыми белками эндогенных ретровирусов [8, 9]. Поэтому иммуносупрессия при гриппе у беременных женщин связана со взаимодействием экзогенных вирусов гриппа и эндогенных ретровирусов плаценты. Фактически речь идет о взаимодействии эндогенных ретровирусов плаценты и экзогенных инфек-

ционных вирусов, использующих идентичный механизм иммуносупрессии [6, 8, 10].

Перед тем как перейти к обсуждению проблемы пандемического гриппа при беременности следует отметить, что опасность развития тяжелых осложнений связана не только с гриппом. При беременности опасность представляет фактически любая инфекция. Кроме гриппа, не меньшую опасность представляют цитомегаловирусная инфекция, инфекционный мононуклеоз и вирус Эпштейна–Барр, корь, геморрагические лихорадки. Все это связано с тем, что инфекционные вирусы используют такой же механизм иммуносупрессии, как и эндогенные вирусы, в значительной степени обеспечивающие защиту полуаллогенного плода от материнской иммунной системы.

На примере гриппозной инфекции взаимодействие вирусов гриппа и эндогенных ретровирусов проявляется со всей очевидностью, а учитывая массовость этой инфекции число клинических наблюдений несравненно больше, чем при каких-либо других инфекциях.

Особенности гриппа при беременности

В период пандемии гриппа 2009/10 гг. беременные женщины относились к наиболее приоритетным группам риска, так как у беременных заболевание гриппом чаще протекает в тяжелой форме, а выбор средств лечения крайне ограничен. «Синдром беременных женщин при гриппе» следует квалифицировать как развитие инфекционного процесса на фоне острой иммуносупрессии, когда физиологическая иммуносупрессия, связанная с беременностью, является фоном, на который накладывается воздействие вирусов на иммунную систему [1, 6, 8, 10, 11–14]. Более того, молниеносное течение гриппа у беременных женщин в некоторых случаях напоминает по клинической картине и состоянию иммунной системы геморрагическую лихорадку Эбола, характеризующуюся особыми механизмами подавления иммунной системы хозяина [15, 16].

По данным исследований академика РАМН В. В. Малеева грипп у беременных женщин может приводить к следующим осложнениям:

- спонтанный аборт;
- преждевременные роды;
- плацентарная недостаточность;
- РДС (респираторный дистресс-синдром);
- антенатальная гибель плода;
- энцефалопатия новорожденных;
- церебральный паралич и мертворожденность;
- низкий вес при рождении.

По данным Белокриницкой с соавт. [17] частота летальных исходов от гриппа, осложненного пневмонией, у матерей составляла 2,5%, а перинатальные потери – 8,3%. Отмечено также, что родоразрешение в разгар осложненного пандемического гриппа H1N1pdm09 сопряжено с прогрессированием полиорганной недостаточности, повышением риска материнской смертности и высокой перинатальной заболеваемостью. Гриппозная инфекция H1N1pdm09 сопровождалась не только пневмониями, но и высокой частотой развития гестозов, фетоплацентарной недостаточности, холестаза и маловодия. У младенцев от матерей с гриппозными пневмониями чаще развивались внутриутробная пневмония, церебральная ишемия, внутрижелудочковые кровоизлияния, судорожный и вегетовисцеральный синдромы, транзиторная дисфункция миокарда [17]

Следует обратить внимание на высокую частоту развития синдрома полиорганной недостаточности у беременных женщин, инфицированных вирусом H1N1pdm09 [1, 7, 14], характерной для таких особо опасных инфекций, как геморрагическая лихорадка Эбола [15, 16]. Системное поражение органов сильно осложняет течение, например пневмонии и дыхательной недостаточности, и часто является признаком перехода заболевания в терминальную фазу.

По общему мнению специалистов, грипп у беременных женщин чаще вызывает тяжелые осложнения, включая пневмонию [12–14]. Одной из причин тяжелых осложнений гриппа и смертельных исходов среди беременных женщин является физиологическое состояние иммунной системы при беременности. Общая иммуносупрессия при беременности связана с некоторыми гормонами (хорионическим гонадотропином, прогестероном), метаболизмом, синтезом альфа-фетопротеина и другими факторами [9].

Имуносупрессия при беременности проявляется слабой реакцией на туберкулиновый тест, длительным ранозаживлением, снижением бактерицидной активности плазмы крови и многими другими признаками [9, 11]. При беременности отмечена ремиссия аутоиммунных заболеваний, например, ревматоидного артрита. При этом признаки ремиссии появляются уже в первый триместр беременности, что свидетельствует о раннем развитии иммуносупрессивных процессов. Беременность не вызывает существенных изменений в гуморальном иммунитете, что делает его очень важным в защите от инфекций в этот период [7, 11, 18].

Еще одна причина тяжелого течения гриппа и других респираторных инфекций при беременности связана с высокой потребностью в кислороде организма матери и плода. Поглощение кислорода прогрессивно усиливается во втором и третьем триместрах

беременности [9]. Растущий плод оказывает давление на диафрагму, что делает дыхательные движения затрудненными, особенно при физической нагрузке и движении. Поэтому любое снижение функций легких сильно отражается на общем состоянии беременных женщин. Более того, при беременности из-за высокой потребности в кислороде повышена чувствительность к гипоксии. В случае развития гипоксии наблюдается высокий уровень продукции деструктивных активных форм кислорода. Свободные радикалы кислорода снижают способность легких и плаценты к транспорту кислорода, а при развитии гриппа вызывают генерализованную провоспалительную реакцию [19–21]. Активные формы кислорода являются индукторами транскрипционных факторов, регулирующих активность генов, кодирующих провоспалительные цитокины. На этом фоне возможно развитие нарушений микроциркуляции и свертывания крови, что приводит к таким грозным осложнениям, как тромбоз легочной артерии.

Кроме этих, хорошо известных причин иммуносупрессии, более важное значение имеет подавление клеточного иммунного ответа [6, 9, 20, 22]. В простых тестах установлено, что сыворотка беременных женщин на всех этапах беременности подавляет пролиферацию полиморфноядерных лимфоцитов. Это свидетельствует о том, что при беременности вырабатываются факторы контроля клеточного иммунного ответа, направленные на защиту плода от реакции материнской иммунной системы на чужеродные антигены плода, начиная с раннего эмбрионального развития [9, 11].

Влияние гриппозной инфекции на плод

Известно, что при тяжелой гипертоксической форме гриппа наблюдается высокая виремия (так называемая вирусная нагрузка), в результате которой происходит инфицирование макрофагов и моноцитов, способствующих диссеминации вирусной инфекции по кровеносному руслу. Естественно, в этих условиях может происходить инфицирование плаценты и проникновение вируса через плацентарный барьер [7]. В ряде источников утверждается, что виремия – нечастое явление при гриппе (4,7,13,18), и плацентарная передача вируса при обычном сезонном гриппе также происходит достаточно редко [7, 23]. Вместе с тем, исследования на животных свидетельствуют о том, что инфицирование плода может привести к ряду негативных последствий. Например, установлено, что пренатальная гриппозная инфекция у мышей вызывает значительные гистологические изменения в головном мозгу (6,23). Также известно, что последствием гриппа у беременных женщин могут быть поведенческие измене-

ния в раннем детском возрасте [23]. С гриппозной инфекцией плода связываются такие психические состояния, как аутизм [23]. В более позднем возрасте могут проявиться такие заболевания, как болезнь Паркинсона [6, 23].

Как уже указывалось, неблагоприятные исходы беременности были зарегистрированы во время и после всех предыдущих пандемий гриппа. Во время пандемии гриппа 1918 года регистрировался удивительно высокий уровень спонтанных аборт и преждевременных родов (до 5,6%) [3–7, 23]. По данным некоторых исследований частота спонтанного аборта существенно возрастает у беременных женщин при развитии у них гриппозной пневмонии (до 50%) [5]. В период азиатской пандемии гриппа 1957 года зарегистрировано увеличение дефектов развития центральной нервной системы среди новорожденных [23]. В этот же период отмечена также высокая частота врожденных пороков развития других органов, спонтанной потери беременности, внутриутробной гибели плода и преждевременных родов [23]. Изучение влияния сезонной гриппозной инфекции на плод были противоречивы. Вместе с тем, статистические исследования связи врожденных дефектов развития с перенесенной гриппозной инфекцией на ранних сроках беременности свидетельствуют о повышенном риске их развития [23]. Статистически значимая ассоциация с гриппом установлена для таких дефектов, как расщелина губы с или без волчьей пасти, а также нервной трубки и врожденных пороков сердца. Очень важным выводом ряда исследований последствий гриппа является снижение риска развития дефектов развития путем использования жаропонижающей терапии и приема фолиевой кислоты до и во время ранней беременности [23].

В последние годы все чаще обсуждаются неврологические осложнения гриппа [25]. Нейротропные свойства вирусов гриппа, проявляющиеся у пандемических вирусов представляют особую опасность при массовом распространении инфекции среди невакцинированных людей [24]. В ряде исследований выявляется возможная связь между перенесенным матерью гриппом и детской лейкемией, шизофренией, болезнью Паркинсона и аутизмом, неврологическими заболеваниями, метаболическими расстройствами [23]. В большинстве исследований утверждается, что на ранних сроках беременности лихорадка для плода является опасным симптомом, так как в этих случаях наблюдается нарушение в развитии нервной трубки [23]. Развитие именно этих дефектов можно предотвратить путем применения жаропонижающих (парацетамола) средств и фолиевой кислоты [23].

Таким образом, гриппозная инфекция опасна как для материнского организма, так и для плода. В научной литературе [3, 4, 13] описаны случаи, когда на третьем триместре гриппозная инфекция приводила к гибели матери, а акушерам удавалось спасти только ребенка [12–14]. Чаще гипертоксический грипп с пневмонией заканчивается как для матери, так и плода фатальным исходом [23].

Именно поэтому необходимы исследования молекулярных механизмов сочетанной иммуносупрессии у беременных женщин с гриппозной инфекцией для разработки мер управления этими процессами и снижения смертности от этой инфекции [6, 24].

Отдаленные эпидемиологические последствия внутриутробного инфицирования плода вирусом гриппа

Следует также иметь в виду, что массовая заболеваемость гриппом среди беременных женщин в период пандемии представляет определенную опасность для формирования поколения детей, у которых вирус гриппа мог войти, стать толерантным и перестать быть чужеродным, распознаваемым иммунной системой патогеном [6, 18, 20]. Это означает, что при инфицировании плода вирусом вирусные антигены могут перейти в разряд компонентов, не вызывающих активного иммунного ответа. Последствия этого процесса различны, но, в первую очередь, могут привести к тому, что дети, рожденные в этих условиях, в связи с отсутствием иммунного ответа на гриппозную инфекцию становятся хроническими носителями персистирующих вирусов гриппа в условиях активной циркуляции вирусов с близкой антигенной структурой. Учитывая длительный антигенный дрейф вирусов гриппа и цикличность пандемий, можно предположить, что в определенный период жизни хронические носители персистентных вирусов гриппа могут вносить существенный вклад в изменчивость циркулирующих вирусов гриппа. При подтверждении такого феномена впервые можно подойти к обоснованию антропонозной концепции происхождения пандемий гриппа, предложенной много лет назад академиком АМН СССР А. А. Смородинцевым [25]. В таком случае бесспорная зоонозная теория с природным резервуаром вирусов гриппа типа А может быть частично дополнена вероятным вкладом популяции человека в эпидемические и пандемические процессы глобальной циркуляции вирусов гриппа. Примирение двух концепций, как завершение острой дискуссии отечественных вирусологов о происхождении пандемии гриппа, было бы полезным для гармонизации взглядов в этой области и более объективной оценки вклада человеческой популяции в эволюцию вирусов гриппа. Есть ряд других аргументов, повышающих научную ценность такого под-

хода к пониманию этой сложной проблемы. Необходимо также подчеркнуть, что в рамках новых представлений возможно объяснение 20-летних циклов крупных эпидемий и пандемий.

Возврату вирусов гриппа в циркуляцию и их устойчивой циркуляции могут способствовать хронические носители вируса или популяция людей, толерантных к вирусу, контактировавшие с данным подтипом вируса в утробе матери.

Поэтому, возвращаясь к гипотезе академика АМН СССР А. А. Смородинцева можно сделать вывод, что атропонозный вклад в пандемические процессы остается сильно недооцененным [25].

Молниеносное течение гриппа и иммуносупрессия

Под молниеносным течением инфекционного заболевания понимается развитие инфекционного процесса с крайне коротким инкубационным периодом, быстрым в течение 1–2 суток развитием основных симптомов заболевания и появлением признаков тяжелых осложнений уже на 3–5-й день заболевания [6, 26]. Переход в тяжелое состояние с нарушением основных функций организма, проявляющийся признаками системного поражения органов, наблюдается уже на 5–6-й день после появления первых симптомов инфекции [1, 7, 26].

Обзорная статья S. Lapinsky [18] посвящена сравнительному анализу клиники и лечения гриппа у беременных и иммуносупрессивных пациентов. Такое сочетание различных групп больных гриппом позволяет реально оценить общие признаки течения гриппа при беременности и системном, лекарственном подавлении иммунитета у, например, больных с трансплантацией органов [18]. Поэтому беременные женщины отнесены как ряд других групп пациентов к обширным когортам иммунокомпроментированных больных. К пациентам с иммуносупрессией относятся больные после пересадки костного мозга, трансплантации почек и других органов, больные ВИЧ-инфекцией, больные с соответствующими наследственными заболеваниями [18]. Несмотря на близкую клиническую картину иммуносупрессии при различных заболеваниях и беременности, необходима классификация этих состояний. Иммуносупрессию при беременности следует выделить в отдельный клинический феномен в соответствии с условиями ее развития и направленностью на обеспечение толерантности к антигенам плода [9, 10].

Известна высокая чувствительность пациентов, находящихся на иммуносупрессивной терапии после операций по трансплантации органов, к различным инфекциям [18]. В первую очередь это относится к цитомегаловирусной инфекции, известной своей высочайшей

иммуносупрессивностью [18] и являющейся серьезной проблемой после операций по трансплантации органов [6, 18]. Иммуносупрессивная активность вируса накладывается на лекарственную иммуносупрессию и приводит к беспрепятственной репликации вируса и быстрой генерализации инфекции. Такой же молниеносный тип течения заболевания характерен для оппортунистических инфекций, например, у ВИЧ-инфицированных больных [6, 18].

В статье Dubag с соавт. [27] иммуносупрессивные состояния включены, наряду с беременностью, в перечень преморбидных состояний, способствующих развитию тяжелых осложнений гриппа. Однако, как будет видно при дальнейшем рассмотрении проблемы, иммуносупрессия у беременных женщин носит специфический характер, направленный, главным образом, на ключевые клеточные элементы иммунной системы [9, 10].

Как уже указывалось, в течение сезонных эпидемических вспышек гриппа и прошедших пандемий среди беременных женщин регистрировалась высокая частота осложненных форм гриппозной инфекции по сравнению с другими категориями пациентов [7, 23, 26]. Это явилось основанием для CDC и ВОЗ отнести беременных женщин к группам риска в периоды распространения гриппа в сезонные периоды и в периоды развития пандемий [26]. Гриппозная инфекция является опасным заболеванием как для матери, так и ребенка [7]. По данным CDC наиболее частым осложнением гриппа для беременности является спонтанный аборт или (II и III триместр) – преждевременные роды [26, 27].

В связи с этим CDC в начале пандемии 2009 года (H1N1) инициировал специальную программу мониторинга случаев пандемического гриппа среди беременных женщин. Уже к 10 мая 2009 года специалистами CDC был проведен детальный анализ 20 случаев гриппозной инфекции среди беременных женщин [26]. В 15 случаях диагноз гриппа был подтвержден лабораторно, а в остальных 5 случаях предположительный диагноз гриппа был поставлен на основе клинических признаков заболевания. Из 20 пациенток 3 были госпитализированы, а одна из них погибла в ПИТ. Позднее число случаев гриппозной инфекции среди беременных женщин прогрессивно увеличивалось, соответственно выросло и число смертельных исходов [7, 17].

Из данного доклада [7] целесообразно привести весьма показательный пример – случай заболевания гриппом H1N1 с молниеносным течением у беременной женщины 33 лет [26].

Пациентка А, 33-х лет, на 35 неделе беременности с симптомами миалгии, сухого кашля и невысокой лихорадкой 15 апреля обследо-

вალაყ у акулшера-гинеколога. Общее состояние пациентки оценивалось как удовлетворительное и пациентке не была назначена какая-либо терапия. Пациентка принимала только пренатальный комплекс витаминов несмотря на то, что у нее в анамнезе было заболевание псориазом и легкой астмой. Пациентка не предпринимала никаких путешествий, в том числе в Мексику, и не могла заразиться гриппом вне места проживания. Постановка быстрого теста на грипп была положительной. Уже 19 апреля, то есть через 4 дня больная была обследована в местном отделении экстренной медицинской помощи с признаками прогрессирующей дыхательной недостаточности, высокой лихорадкой и продуктивным кашлем. В результате дальнейшего обследования пациентке был поставлен диагноз тяжелого легочного дистресс-синдрома, с насыщением O_2 около 80% и частотой дыхания 30/мин. На рентгенограмме выявлены двусторонние узелковые инфильтраты. Пациентка нуждалась в вентиляции легких и была помещена в ПИТ на механическую вентиляцию. В этот же день была проведена операция кесарева сечения. Новорожденный ребенок был здоров и отправлен домой. Только с 28 апреля пациентка стала принимать осельтамивир в качестве противовирусной терапии в сочетании с антибиотиками и дыхательной поддержкой. Пациентка умерла 04 мая 2009 года [26].

Из приведенной выписки можно сделать следующие выводы:

1. Через 4 дня после первых относительно слабых симптомов гриппа H1N1 у пациентки развилось тяжелое осложнение в виде дыхательной недостаточности с пневмоническими очагами и переходом в тяжелый острый респираторный синдром. Фактически переход в тяжелый легочный дистресс-синдром произошел в течение суток. Терминальное состояние у пациентки развилось в течение суток. Родоразрешение было осуществлено путем кесарева сечения для спасения жизни ребенка и матери.

2. Крайне позднее начало противовирусной и противовоспалительной терапии (пациентка имела в анамнезе псориаз и легкую астму), вероятнее всего в значительной степени определило исход заболевания. Первые симптомы болезни у пациентки появились 15 апреля, 19 апреля поступление в ПИТ, а только 28 апреля был назначен осельтамивир.

3. Совершенство оказания помощи в палатах интенсивной терапии (возможность длительного поддержания жизненно важных функций при тяжелых поражениях легких) позволило продлить жизнь пациентки до 04 мая.

Столь быстрое развитие заболевания характерно для иммуносупрессивных больных или пациентов с тяжелым преморбидным

фоном. В случае с беременными женщинами есть основания в значительной степени отнести быстрое развитие осложнений за счет физиологической иммуносупрессии и отсутствия активной противовирусной защиты, как ответа на инфекцию [18].

В целом, в зарубежных и отечественных клинических обзорах можно детально познакомиться с практикой лечения пандемического гриппа H1N1pdm [1, 6, 7, 13, 16]. Обращает на себя внимание публикация по детальному описанию практики в этот период во Франции [27]. В статье подробно описаны клиника, течение заболевания, роль преморбидного фона в развитии осложнений, практика лечения осложнений гриппа у беременных женщин в ПИТ [27]. Высокий уровень оказания медицинской помощи беременным женщинам при гриппе обеспечил во Франции наиболее низкую смертность по сравнению с США и Австралией [7, 27]. В большинстве случаев авторы [27] отмечают два фактора, играющих ключевую роль в развитии осложнений:

- позднее обращение за медицинской помощью;
- позднее назначение противовирусной терапии.

Опережая изложение, «синдром беременных женщин при гриппе» следует квалифицировать, как развитие инфекционного процесса на фоне длительной, вызванной беременностью, иммуносупрессии, когда действие вирусов на иммунную систему накладывается на физиологическую иммуносупрессию беременных [27]. Еще раз следует напомнить, что молниеносное течение гриппа у беременных женщин в некоторых случаях напоминает по клинической картине и состоянию иммунной системы геморрагическую лихорадку Эбола [15, 16]. Такое неожиданное сравнение будет обосновано ниже.

Природа и механизмы иммуносупрессии при беременности

Механизмы иммуносупрессии у беременных женщин до настоящего времени остаются недостаточно изученными [8–10]. Как уже указывалось, существует общее представление о том, что преимущественно гормональный фон, свойственный беременности, играет наиболее важную роль в иммунном статусе в течение беременности [9]. Среди факторов, вызывающих иммуносупрессию отмечаются прогестерон и общий гормональный фон, бета2-микроглобулин, альфа-фетопротейн и другие факторы, характерные для беременности. Наиболее важным фактором является общая иммуносупрессивная активность плазмы и сыворотки крови беременных женщин, наблюдаемая уже с самых ранних сроков беременности [9].

На ранних стадиях беременности взаимодействие между инвазирующими фетальными трофобластами и материнскими децидуаль-

ными клетками является критическим. Для этого необходима координация экспрессии родительских антигенов, регулирующих это взаимодействие [9, 28]. Инвазия трофобластов, с одной стороны, должна стимулироваться, а с другой – жестко контролироваться по глубине проникновения в слизистую оболочку матки. Это требует экспрессии систем (сигналов), обеспечивающих деградацию тканей, факторов, подавляющих этот процесс, и промотирующих репарацию и ангиогенез.

Кроме этого, плод должен быть защищен от иммунной системы материнского организма соответствующим барьером и иммуносупрессивными сигналами. Децидуальные мононуклеарные клетки секретируют ИФН- γ , ИЛ-4 и ИЛ-10. Ряд факторов секретируется НК-клетками и макрофагами. ИФН- γ является морфогенетическим фактором роста спиралевидной артерии, ремоделирования и инвазии тканей и, вероятно, контроля Th1-клеточного иммунного ответа плода [28].

Одновременная экспрессия ИЛ-4, вероятно, необходима для подавления Th1-иммунного ответа. Ил-10 может также быть необходимым в качестве иммуносупрессора в подавлении активации НК-клеток и цитотоксическим регулятором чрезмерной инвазии трофобластов. Как ИЛ-4, так и ИЛ-10 в совокупности с другими локальными факторами, включая гормоны и ростовые факторы, контролируют дифференцировку макрофагов [28]. Децидуальные макрофаги экспрессируют гены, контролирующие инвазию трофобластов (MMP-9, A2M), ангиогенез в плаценте (IGF-1, GAS-6, PROS1) и клиренс апоптотических клеток (FN1, C1Q).

Фрагменты фагоцитированных клеток презентуются макрофагальным HLA II, но в силу низкого уровня экспрессии этих компонентов главного комплекса гистосовместимости (HLA) не приводят к активации Т-лимфоцитов, а, наоборот, вызывают супрессию. Макрофаги экспрессируют рецепторы иммунорегуляции – MRC-1, CD9, TREM-2, NRP-1, CD209, которые осуществляют регуляцию активности макрофагов и кооперацию клеток иммунной системы (рис. 1). Макрофаги секретируют белки CCL18,IDO, PGDS, CCL-2, которые регулируют миграцию лимфоцитов и макрофагов [28].

Децидуальные мононуклеарные клетки активно секретируют IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10 и TGF- β . Вероятно, в процессе беременности эти цитокины регулируют иммунный ответ Th1-типа. Предполагается также, что синтез цитокинов необходим на терминальной стадии беременности для обеспечения иммунной защиты рожениц и устранения длительной иммуносупрессии [28].

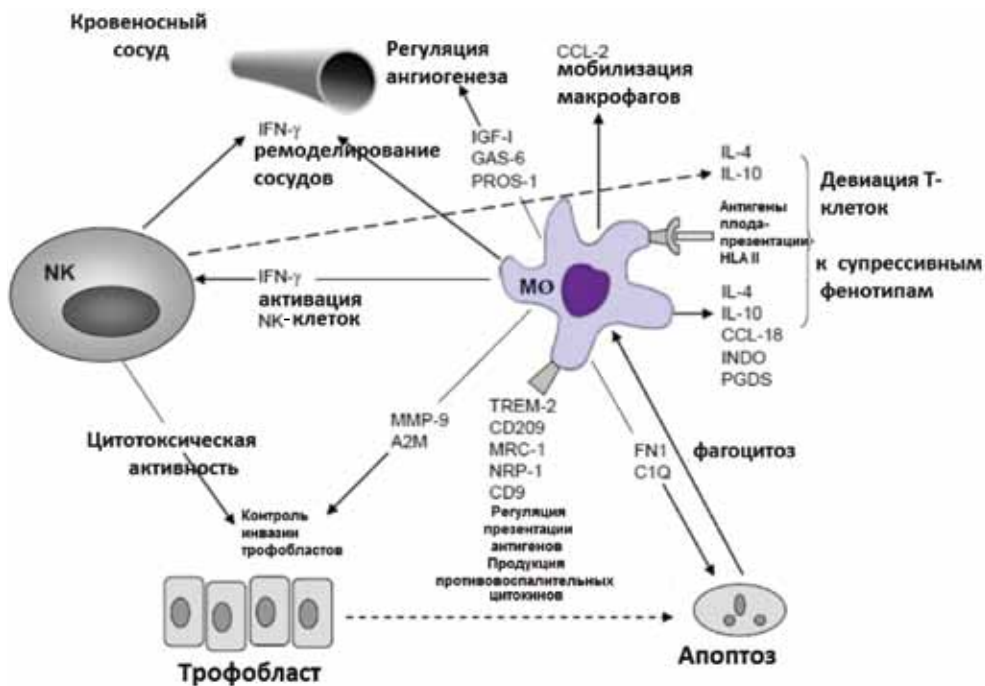


Рис. 1. Схема кооперации клеток иммунной системы и трофобластов в развитии плаценты и контроля иммунной системы в процессе беременности [28]. Основные обозначения на рисунке: НК – натуральные киллерные клетки, МО – макрофаги. Кровеносные сосуды, внизу – трофобласты – инвазия трофобластов, апоптотические клетки (инвазия в сочетании с элиминацией клеток – ремоделирование тканей). Остальные обозначения относятся к рецепторам и белкам (наименования даны в международной номенклатуре), контролирующим 5 основных процессов: ангиогенез, включая рост створчатых спиралевидных артерий, активность НК-клеток, регуляцию инвазии трофобластов. Макрофаги осуществляют контроль инвазии трофобластов и апоптоз клеток – ремоделирование тканей и элиминацию клеток иммунной системы и тканей матки, контроль презентации антигенов плода, супрессию Т-лимфоцитов и контроль толерантности. Основные пояснения даны в тексте

Изучение цитокинов дает только поверхностную картину состояния иммунной системы, так как не позволяет оценить состояние отдельных субпопуляций лимфоцитов. Поэтому активно развиваются другие подходы, позволяющие более объективно оценить экспрессию генов и состояние Т-клеток. Однако большинство этих исследований не связаны с эволюционными представлениями об особой роли иммунной системы при беременности и строении генома человека.

В последние годы расширились исследования экспрессии генома в процессе развития плаценты и беременности [8–10, 28]. Эти исследования в ближайшее время приведут к расшифровке механизмов кооперации эндогенных ретровирусов (ЭРВ) и клеточных генов в развитии и генетическом контроле функций плаценты [6, 8, 10, 19]. Иммуносупрессия с участием ЭРВ носит генерализованный характер, то есть она не локализована только в плаценте. Поэтому понятие иммуносупрессивного барьера плаценты достаточно условно, но при этом очевидно, что основные механизмы иммуносупрессии реализуются именно в плаценте на границе мать/плод [19, 22]. Механизмы генерализации экспрессии иммуносупрессивных генов ЭРВ оказались уникальными и непосредственно связанными с секреторными функциями плацентарных клеток [6].

Однако нельзя не отметить, что изучение генетического контроля морфогенеза плаценты и эволюционной роли эндогенных ретровирусов в эволюции плацентарности и иммуносупрессивной защите плода от реакций иммунной системы матери осуществляется параллельно с основными исследованиями в этой области без прямой связи с физиологией и патологией беременности [6, 8, 22]. Эволюционная связь ЭРВ и инфекционных вирусов неожиданным образом проясняется на уровне механизмов иммуносупрессии [8, 29]. Такой подход оказался наиболее перспективным при изучении проблемы тяжелого течения гриппа у беременных женщин. Следует отметить, что четыре основных достижения современной молекулярной биологии привели к возможности достижения глубокого понимания механизмов иммуносупрессии и механизмов развития осложнений инфекционной патологии при беременности:

- расшифровка функций ключевых генов эндогенных ретровирусов в плаценте;
- расшифровка структуры Т-клеточных рецепторов и механизмов активации Т-клеток;
- идентификация иммуносупрессивных доменов у белков ретровирусов и инфекционных с высоким уровнем патогенности;
- открытие экзосомного пути секреции иммуносупрессивных детерминант в плаценте.

Эндогенные ретровирусы, плацента и плацентарные иммуносупрессоры

Совместно с В. И. Покровским [1] на Форуме инфекционистов России в марте 2010 года была впервые представлена новая концепция иммуносупрессии у беременных женщин, на основе которой возможно решение многих вопросов патологии беременности и вы-

сокой чувствительности беременных женщин к гриппозной инфекции. Концепция основана на объяснении механизмов генерализации иммуносупрессии, сопутствующей беременности, в связи с экспрессией иммуносупрессивных элементов ЭРВ плаценты и их гомологов у инфекционных вирусов, в данном случае у вирусов гриппа [6, 26]. Иммуносупрессия, вызванная вирусом гриппа, использующим такой же молекулярный механизм, как эндогенные ретровирусы, приводит к настолько сильному дисбалансу в этих процессах, что состояние иммунной системы организма беременной приближается к параличу. Роль ретровирусов в обеспечении иммуносупрессивного барьера плаценты, в первую очередь, подтверждается тем, что плацента относится к единственным органам млекопитающих, в котором наблюдается высокая экспрессия генов ЭРВ и продукция вирусных частиц эндогенных ретровирусов [8, 29]. Более того, в плаценте экспрессируются гомологи белков *env* эндогенных ретровирусов, которые в процессе эволюции функционально дифференцированы на выполнение функций слияния и иммуносупрессии [29]. При этом функции генетического контроля морфогенеза плаценты объединены с функциями иммуносупрессии [6, 29]. У большинства других вирусов, например ВИЧ-1, эти функции объединены в один домен слияния [6, 30]. Исключением являются инфекционные вирусы, включая вирус гриппа, обладающие независимыми детерминантами иммуносупрессии в неструктурных белках [6, 31, 32].

Концепция иммуносупрессии у беременных женщин основана на понимании механизмов генерализации подавления основных функций клеточного иммунитета, сопутствующего беременности в связи с экспрессией иммуносупрессивных элементов эндогенных ретровирусов плаценты [1, 6]. На рис. 2 представлена экспрессия эндогенных ретровирусов в тканях животных и человека [8, 10].

Как видно из рис. 2, высокий уровень экспрессии эндогенного вируса *HERV* наблюдается только в плаценте. В большинстве других тканей уровень экспрессии (по гену *env*) носит пороговый (базисный) характер, но чаще всего транскрипция ЭРВ отсутствует [6, 8]. В первую очередь высокий уровень экспрессии относится к белкам *env*.

Структура генома ретровируса *HERV* включает в себя гены *gag*, *pol* и *env* (рис. 2). Все гены необходимы для репликации (*pol*), образования вирусных частиц – капсидации (*gag*) и образования белково–липидной оболочки (*env*). LTR – длинные концевые повторы необходимы для интеграции и реинтеграции (рис. 2). Белок *env* получил название синцитина за его способность к образованию синцития. Суть этого процесса сводится к слиянию моноядерных клеток в крупные трофобластные синцитиальные – многоядерные. При огра-

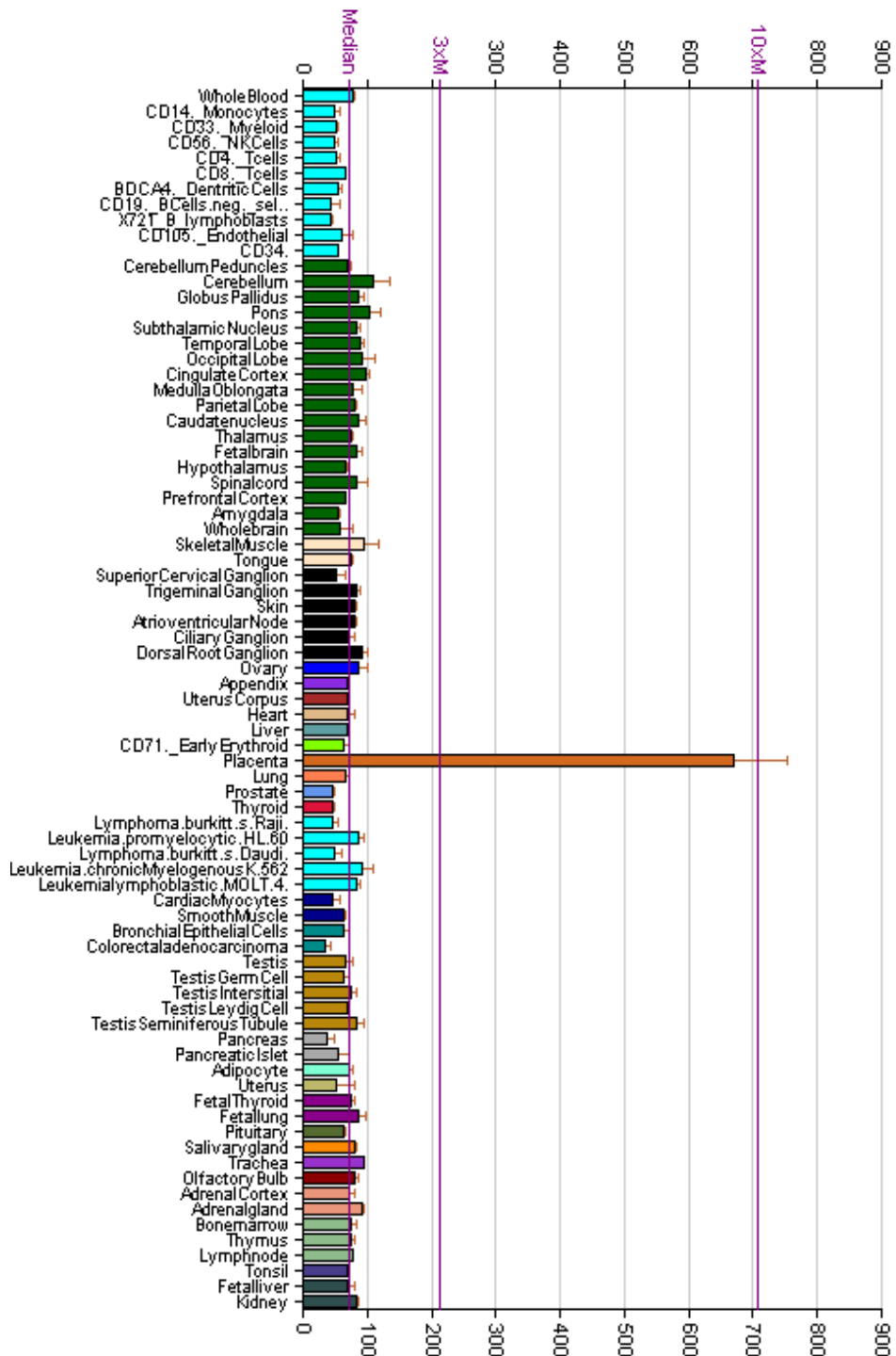


Рис. 2. Экспрессия эндогенного ретровируса HERV в тканях человека [8]

ничении образования синцитиальных структур происходит нарушение развития плаценты и возникает невозможность имплантации бластоцисты и вынашивания плода [29]. Таким образом, в процессе развития плаценты происходит полноценная экспрессия ретровируса *HERV*, обеспечивающая морфогенез плаценты, что одновременно сопровождается образованием интрацистернальных вирусных частиц (см. рис. 3).

Иммуносупрессивные домены вирусных и плацентарных белков: синцитин 1 и синцитин 2

Белок env ретровируса *HERV* обладает фьюзогенными и образующими синцитий функциями [8,10]. По центру трансмембранной части локализуется так называемый иммуносупрессивный домен (ИСД). В большинстве случаев ИСД локализуется в непосредственной близости от пептида слияния (рис. 3). Локализация ИСД, по-видимому, имеет принципиальное значение. Впервые этот домен идентифицирован в виде пептида CSK-17 у эндогенных ретровирусов [10]. Сердцевинный – коровый домен этого белка отличается высокой гидрофобностью, обогащен остатками лейцина и представлен гексапептидом LDLLFL, который в большинстве случаев фланкирован положительно заряженными аминокислотными остатками [32]. Такая же закономерность выявляется при сравнительном анализе ИСД – последовательностей ретровирусов животных и человека. На рис. 4 приведена первичная структура ИСД ретровирусов в сравнении с пептидом CSK-17.

На рис. 4 видно, что «коровые» последовательности, обогащенные лейцином, практически идентичны у всех представителей ИСД [6, 33]. В первую очередь следует отметить, что общая структура ИСД-последовательностей совпадает у инфекционных и эндогенных ретровирусов. Так, после идентификации ИСД у ретровирусов аналогичный домен с такими же функциями был выявлен в белке GP2 вируса геморрагической лихорадки Эбола [33].

Как уже указывалось, эволюция ЭРВ у плацентарных животных привела к разделению и функциональной дифференцировке двух генов *env*: *env-ERVWE1* и *envFRD*, соответствующих у человека синцитину 1 и синцитину 2 [34–36]. На рис. 5 представлена схема строения и пространственная модель белка env F-MLV ретровируса мышей [34].

Существенным отличием двух доменов является наличие в вирусоспецифической (*envMLV*) последовательности дополнительного положительно заряженного остатка лизина (K), что может быть необходимым для более высокой иммуносупрессивной активности [34].

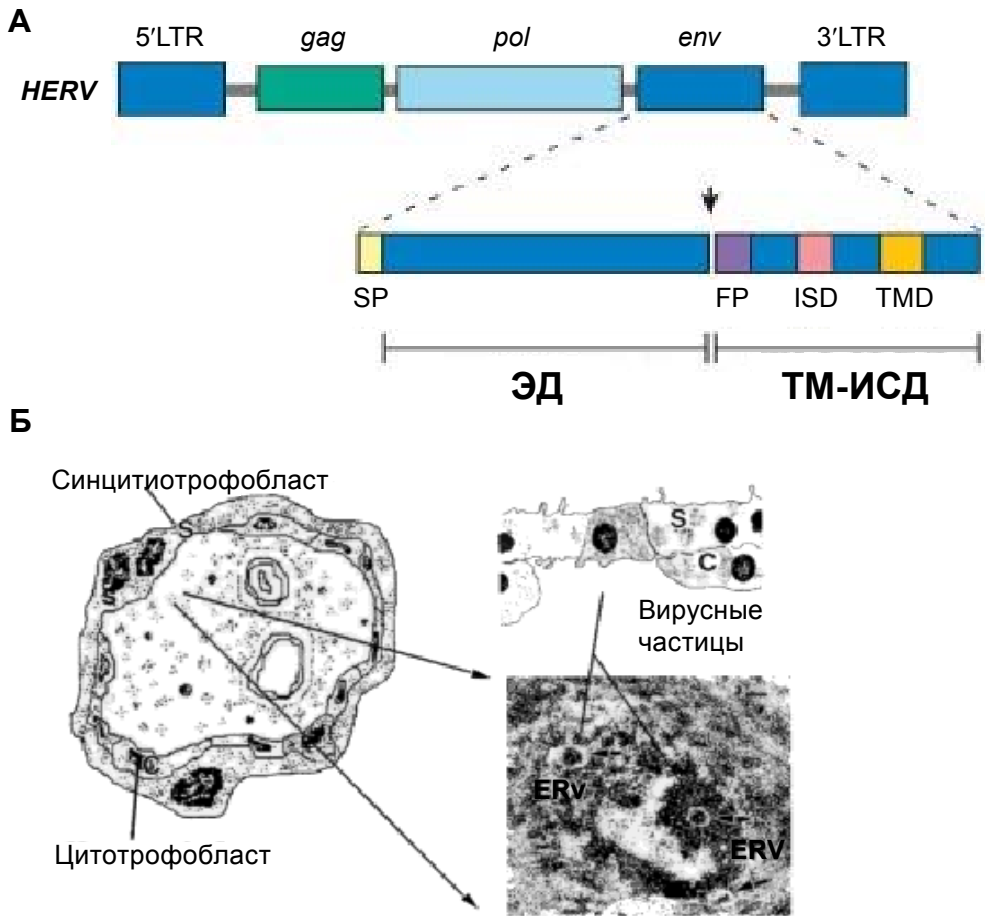


Рис. 3. Генетическая структура (карта) эндогенного ретровируса человека (HERV) с указанием длинных концевых повторов (LTR) и генов, кодирующих белки *gag*, *pol*, *env*. А – на карте белка выделены домены поверхностной (ЭД) и трансмембранной (ТМ) частей. В пределах трансмембранной части (ТД) выделены FP – пептид слияния (фьюжсин), ISD – иммуносупрессивный домен (ИСД), ТМД – трансмембранный домен, ориентирующий белок *env* – в мембране. Б – морфогенез синцитиотрофобласта и локализация эндогенных вирусных частиц [8]

На рис. 5 выделена последовательность ретровирусного белка *env*, являющаяся ключевой в проявлении иммуносупрессивных свойств вируса. Однако фланкирующие последовательности с N- и C-концов домена обеспечивают как определенную конформацию основного домена, так и реализацию его активности. Изолированные синтетические пептиды – гомологи ИСД существенно уступают в активности

FeLVp15E	QNRRGL LDILFL QEGGL
HTLV-1/2gp21eE	QNRRGL LDILFL QEGGL
ERV3 Env	QNRL ALDYLLA QEEGV
HERV-W Env	LQNRR ALDLL TAERGGL
• CSK-17	LQNRRGL LDLLFL KEGGL

Рис. 4. Первичная структура иммуносупрессивных доменов ретровирусов животных и человека [33]

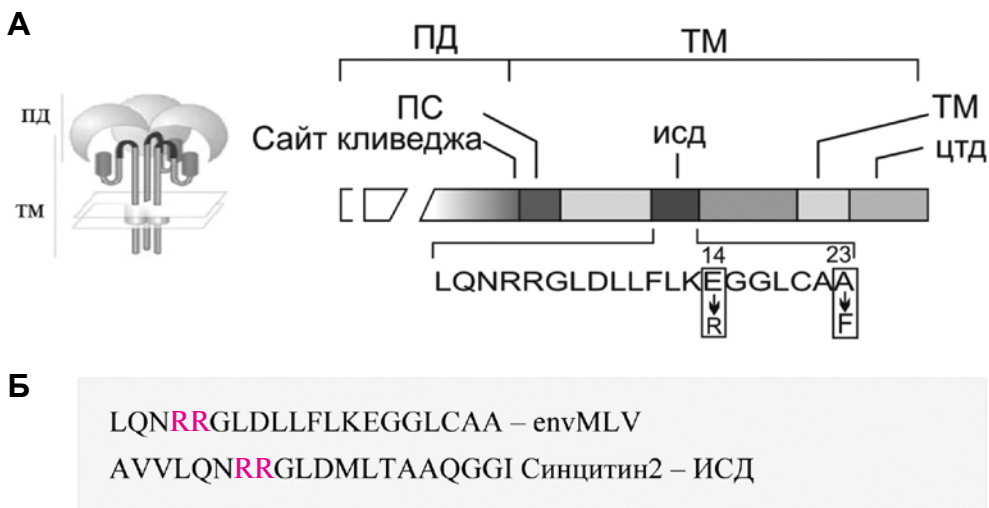


Рис. 5. Строение белка F-MLV Env и его фьюзогенных и иммуносупрессивных детерминант [34]. **А** – модель белка env, сверху в виде трех «лепестков» представлен поверхностный домен, соединенный с ТМД только сульфгидрильными связями. ТМД также представлен в виде тримера. Спирали мономеров изогнуты в последовательности, соединяющей N- и C-концевые гептаповторы. В этом домене локализуется последовательность ИСД, которая несмотря на гидрофобность экспонирована на поверхности молекулы. На рис. 4 также выделены аминокислотные остатки, определяющие функциональную активность домена, обеспечивающие необходимую локальную конформацию. **Б** – последовательности ИСД вирусного белка envMLV и синцитина 2

структурам, близким к природной как у вирусных белков, так и у синцитина 2 [6, 34–36]. Кроме структурных ограничений на уровне иммуносупрессорных белков существуют и ограничения в их транспорте и взаимодействии с клетками иммунной системы. Очевид-

но, что действие иммуносупрессоров не ограничено плацентарным барьером.

Иммуносупрессивные домены эндогенных ретровирусов: сходство с современными инфекционными вирусами

В исследованиях иммуносупрессоров ретровирусов установлено, что для инфекционных ретровирусов ИСД являются фактором патогенности [33]. Предварительные исследования ИСД у вирусов гриппа привели к такому же выводу: высокопатогенные вирусы гриппа отличаются высоким уровнем иммуносупрессивной активности при сохранении способности к индукции «цитокинового шторма». Более того, у пандемических вирусов гомологи ИСД локализованы не только в белке NS1, но и в белке NS2 [37].

Сравнительный анализ структуры ИСД у более обширных групп вирусов показал, что подобные домены свойственны многим вирусам животных и человека, а у вируса ВИЧ-1 данный домен локализуется в непосредственной близости от пептида слияния – фактора инвазивности вируса, определяющего способность к эффективному инфицированию Т-лимфоцитов [31]. При этом в работе Сигалова [31, 32] представлены принципиально новые механизмы действия как пептидов слияния, так и ближайших к ним доменов, известных как ИСД. Согласно с данными этой работы [32], как фьюзогенные пептиды, так и пептиды типа ИСД могут проявлять иммуномодулирующие функции. Иммуномодуляция в этом случае может осуществляться путем трансмембранного взаимодействия с ТМД TCR α -рецепторов, являющимися ключевыми факторами активации Т-лимфоцитов [6, 31, 32]. Действительно, фьюжин пептиды ВИЧ-1 gp41 обладают прямым ингибирующим действием на активацию Т-лимфоцитов, эффективно подавляя их функции в условиях действия антигенного стимула [31]. Такое сочетание функций слияния и иммуносупрессии необходимо, по-видимому, всем Т-лимфотропным вирусам для предотвращения активации противовирусной защиты в самом начале инфекции [6,31].

На рис. 6 представлены последовательности ИС-доменов у различных ретровирусов. В продолжение этого перечня на рис. 6 приводится первичная структура ИСД более широкого перечня вирусов, включая такие вирусы, как цитомегаловирус, вирусы геморрагических лихорадок [32, 33]. Последовательности для ВИЧ-1, цитомегаловируса и ряда других особо опасных вирусов представлены с областью пептидов слияния, характерной особенностью которых является обогащенность остатками глицина (G).

HIV gp41 FP	AVGIGALFLGFLGAAGSTMGAR RS MTLTVQAR QL
LASV FP	GTFTWTLSDSSEGKDTPGGYCL TR WMLIEAEL K CFGNTAV
LCMV FP	GTFTWTLSDSSGVENPGGYCL TK WMLIAAEL K CFGNTAV
MOPV FP	GLFTWTLSDSSEGNMPPGGYCL TR SMLIGLDL K CFGNTAI
TACV FP	AFFSWSLTDPLGNEAPGGYCLE K WMLVASEL K CFGNTAI
CKS-17	LQN RR RGLDLLFL K EGGL
SEBOV	ILN R KAIDFLLR R WGWT
ZEBOV	ILN R KAIDFLLQ R WGWT
MARV	LIN R HAIDFLL T RWGWT
Fr-MLV	LQN RR RGLDLLFL K EGGL

TMD TcR α CP – коровый пептид **GLR⁺ILLLK⁺V**

Рис. 6. Сравнение последовательностей различных вирусных белков по доменам, проявляющим иммуносупрессорную активность (ИСД) [32,33]. Сокращения: HIVgp41 FP – вирус иммунодефицита человека – ВИЧ, FP – фьюзогенный пептид, TMD – трансмембранный домен, CSK-17 – синтетический гептадекапептид белков оболочки ретровируса кошек (FeLV), LASV FP – вирус Ласса, LCMV FP – вирус лимфоцитарного хориоменингита, MARV – вирус болезни Марбурга, MOPV – вирус Мопеа, SEBOV – вирус Эбола, штамм Судан, ZEBOV – штамм Заир, TACV FP – вирус Такарибе, TCR α TMD – трансмембранный домен T-клеточного рецептора, TCR α CP «коровый пептид» трансмембранного домена T-клеточного рецептора

Мишенью для потенциальных сайтов ИСД (рис. 6), является область корового пептида трансмембранного сегмента TCR α [32, 33]. Следует еще раз обратить внимание, что у большинства вирусов иммуносупрессорный «коровый» домен фланкирован положительно заряженными аргинином и лизином, что, вероятно, существенно для его связывания с TCR α и антигенами HLA. Этот уникальный механизм действия вирусоспецифических пептидов обрывает на самом начальном этапе реакцию T-лимфоцитов на вирусные и другие антигены и блокирует распознавание чужеродных антигенов в организме [6]. Данный механизм действия быстро реализуется в условиях активной репродукции и диссеминации вируса в организме [6, 41].

Иммуносупрессивные домены пандемических вирусов гриппа

Гриппозной инфекции, вызванной штаммами с повышенным уровнем патогенности, характерной, в первую очередь, для пандемических вирусов, свойственно два основных парадокса:

- прогрессирующая в процессе развития заболевания иммуносупрессия на грани иммунопаралича;

– цитокиновый шторм – предельно высокий уровень провоспалительных цитокинов в периферической крови и пораженных тканях [1, 24, 30, 38].

Иммуносупрессия при гриппе является, как правило, следствием лейкопении. Особенно это характерно для заболевания, вызванного вирусом *H5N1* [2, 24]. Механизмы развития лейкопении при гриппе известны и связаны с инфицированием макрофагов и моноцитов и их массовым апоптозом, вызванным действием белка PB1-F2 [39, 40]. Вместе с тем, лейкопения менее характерна для пандемического гриппа *H1N1pdm09* [24], так как открытая рамка считывания PB1-F2 у этого вируса практически полностью deletирована. Поэтому у пандемических вирусов *H1N1* 1918 года и *H1N1pdm09* существенное значение имеют ИС-домены белков NS1 и NS2 [37].

При этом, в пределах иммуносупрессивных последовательностей, с одной стороны, высокий консерватизм «коровой» последовательности ИСД, с другой стороны, у штаммов, отличающихся высочайшей патогенностью, можно отметить усиление консенсуса путем включения остатков ароматических аминокислот [24, 37], что сближает эти вирусы с вирусом Эбола [33]. Так, у вирусов «испанки» 1918 года и вирусов *H5N1* (A/VN.1203.04) в положении 143 локализуется остаток тирозина, а у менее патогенного вируса *H1N1pdm09* – треонина (рис. 7).

Белок NS1 вирусов гриппа относится к многофункциональным белкам вирусов гриппа типа А [24]. Поэтому представляет интерес локализация и свойства ИСД по отношению к другим функционально важным доменам. ИСД белка NS1 локализуется между SH2- и SH3-доменами и экспонирован на поверхности молекулы [24]. Принципиальное отличие ИСД белка NS1 от аналогов у ретровирусов состоит в том, что ИСД локализован в неструктурном белке, синтез которого индуцируется в инфицированных клетках на ранней стадии инфекции. В связи с этим данный механизм иммуносупрессии «включается» позднее и зависит от активности репродукции вируса. Таким образом, для пандемических вирусов гриппа иммуносупрессия не сцеплена с факторами трансмиссивности и инвазии. Действие на функции лимфоцитов осуществляется путем распространения фактора иммуносупрессии при активации Т-клеток в ответ на вирусную инфекцию. Вероятно, это общее свойство высокопатогенных вирусов, вызывающих острый инфекционный процесс. Этим и объясняется парадокс супериндукции синтеза цитокинов при подавлении ключевых функций иммунитета [1, 24].



A/Teal/97	140-RLEALILLRAFT
A/HK/483/97	140-RLEALILLRAFT
A/VN/1203/04	140-RLEYLILLRAFT
A/H1N1/1918	140-RLEYLILLRAFT
A/Mallard/NY/6750/1978(H2N2)	140-RLETLILLRAFT
A/C.-Петербург./04/09	140-RLETLILLRAFT
FeLV p15E	RRGLDILFLQEGG
CSK-17	LQNRRLDLLFLKEGGL

Рис. 7. Структура иммуносупрессивных доменов эндогенных ретровирусов, вирусов Эбола и гриппа H1N1pdm09. Последовательность пептида CSK-17 – первого идентифицированного ИСД, впервые идентифицированного у эндогенных ретровирусов [33, 37]. На рисунке приведена полная карта белка NS1 вируса H5N1 с выделением характерных мутаций и основной последовательности ИСД. Ниже приводятся идентичные домены вирусов различного происхождения и отечественного изолята пандемического вируса гриппа A/Санкт-Петербург/07/2009 (H1N1v–2009). Последовательность этого белка неизменна для всех географических изолятов пандемического вируса гриппа A/H1N1v–2009

Блок активации TcR – рецепторов доменами ИСД

Основной механизм действия ИСД связан с уникальным процессом, который имеет прямое отношение к иммуносупрессии как при беременности, так и при вирусных инфекциях. Эти процессы реализуются на уровне рецепторов Т-лимфоцитов и НК-клеток, функции которых являются ключевыми в контроле иммунного барьера в плаценте и в обеспечении противовирусной защиты [6, 24].

На рис. 8 представлены схемы строения ТсR-рецептора и его сигнальных компонентов [42]. В области изучения строения ТсR-рецепторов и механизмов самосборки сигнального рецепторного комплекса Т-клеток в последние годы достигнут значительный прогресс. Это связано в значительной степени с расширением методических возможностей изучения взаимодействия белков в клеточных мембранах [42]. Концепция строения и функционирования Т-клеточного сигнального комплекса рассмотрена в ряде обзорных статей, в которых детально описаны строение и механизмы сборки этого сложного надмолекулярного образования, определяющего пути и механизмы распознавания антигенов и активации Т-лимфоцитов [42]. В статье Manolios с соавт. [42] авторы кратко излагают известные механизмы распознавания антигена Т-клеточными рецепторами и в виде гипотезы предлагают концепцию структурно-функциональной организации нового типа сигнального комплекса [42]. Антигенные пептиды инициируют Т-клеточный иммунный ответ путем взаимодействия с Т-клеточными рецепторами. ТсR – рецепторы являются одними из наиболее сложных по строению и механизмам самосборки клеточными рецепторами, состоящими из 6 различных субъединиц. Распознавание антигена осуществляется α - и β -субъединицами собственно ТсR-рецептора, а трансмиссия сигнала осуществляется субъединицами CD3 в виде димеров субъединиц $\delta\epsilon$, $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$ [42]. Для передачи сигнала в цитоплазму клеток, а затем в клеточное ядро субъединицы CD-корцепторов должны войти в состав сигнального комплекса рецептора. Эта часть процесса чрезвычайно важна для димеризации α - и β -субъединиц, что более детально будет рассмотрено ниже. После димеризации α - и β -субъединиц ТсR-рецептора и ассоциации с димерами CD3-корцепторов происходит фосфорилирование 10 тирозинсодержащих мотивов (ITAM) в цитоплазматических субъединицах CD3-корцептора, что приводит к активации Т-рецептора.

Механизмы активации Т-клеточных рецепторов в значительной степени прояснились после идентификации так называемых «коровых» пептидов, способных ингибировать активацию Т-рецепторов на стадии взаимодействия ТсR-CD3 компонентов [42]. Ключевым фактором концепции является тримодальная сигнальная система Т-клеток, предложенная авторами [42]. Существование концепции состоит в том, что в отличие от ранее принятого мнения о том, что рецепторный комплекс функционирует как двухкомпонентный- ζ - ζ и CD $\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, предлагается функционирование трех разных димерных модулей: CD $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ ζ_2 [42, 43]. Как будет видно из дальнейшего изложения – это очень важно как для расшифровки механизмов действия

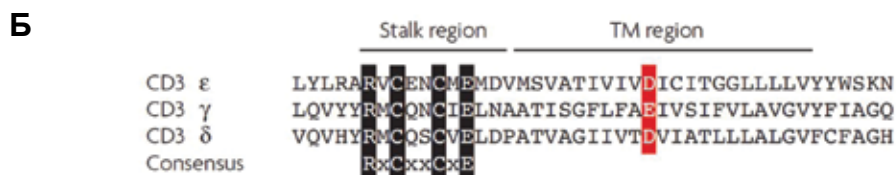
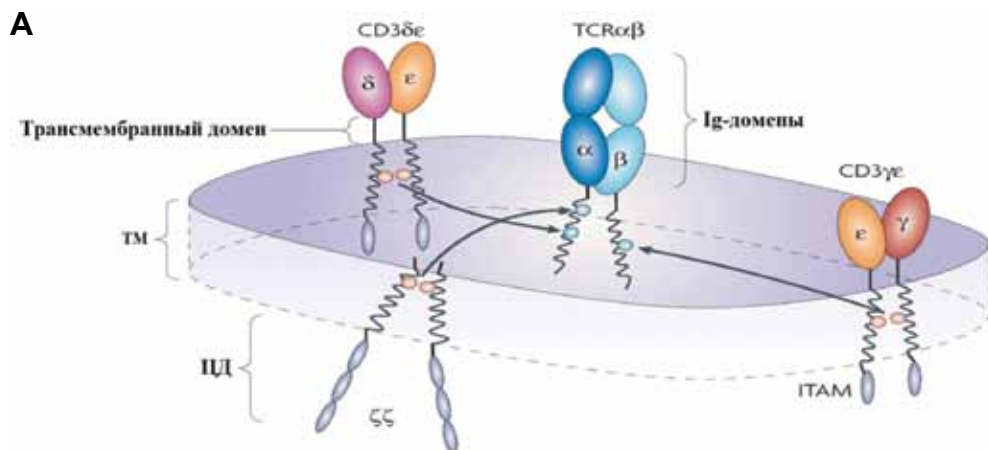
иммуносупрессивных доменов клеточных (плацентарных) и вирусных белков, так и создания соответствующих средств управления функциями Т-клеточных рецепторов (рис. 8).

TCR $\alpha\beta$ – модуль представляет собой тройной комплекс МНС–пептид (антиген)–TCR–рецептор. Из данных исследования третичной структуры установлено, что TCR $\delta\epsilon$ and TCR $\gamma\epsilon$ модули образуются также в результате формирования надмембранных дисульфидных связей в пределах иммуноглобулиноподобных доменов. Стехиометрический состав комплексов может варьировать в зависимости от дополнительных (вспомогательных компонентов CD3). Цитоплазматические домены δ , ϵ , γ и ζ -субъединицы в составе комплекса составляют 1–3 копии, несущие тирозинсодержащие мотивы: YxxLx6–8YxxL, которые после стабилизации димера подвергаются фосфорилированию мембрано-ассоциированными киназами [43]. Самый представительный домен комплекса модуль $\zeta\zeta$ образует ассоциированный с мембранами спираль–спиральный комплекс и является ключевым в процессе трансдукции сигнала [43–46].

На рис. 8 представлены структурные модели TcR $\alpha\beta$ – рецептора и субъединицы CD3 $\delta\epsilon$, $\gamma\epsilon$ и $\zeta\zeta$ в виде нековалентносвязанных димеров. Ассоциация каждой из трех типов субъединиц в димер с TcR–рецептором осуществляется в трансмембранной части TcR через взаимодействие с положительно заряженными аминокислотными остатками (обозначены голубым цветом) и отрицательно заряженными аминокислотными остатками ТМ – доменов субъединиц CD3 из сигнального модуля. В качестве отрицательно заряженных аминокислотных остатков представлены аспарагиновая или глутаминовая кислоты. ITAM – консенсус-последовательность сайта фосфорилирования тирозин-киназой [43–46].

Следует обратить внимание на высокую гомологию ИС-доменов ретровирусов и вирусов гриппа. Все ИС-домены содержат отрицательно заряженные остатки глутаминовой кислоты, обладают близким уровнем гидрофобности, определяющей способность к интеграции в мембраны, фланкированы положительно заряженными остатками аргинина (R) и лизина (K).

Внутримембранные взаимодействия гомологичных доменов компонентов комплекса TcR–рецепторов осуществляются на основе гидрофобных взаимодействий, важнейший вклад в которые свойственен остаткам лейцина и изолейцина (преимущественно взаимодействие лейцин-зиппер мотивов). Дополнительный вклад в димеризацию вносят ароматические аминокислотные остатки [43]. Следует также отметить, что в премембранной области CD3 рецепторов локализуются остатки цистеина. Дисульфидные связи между



В

Ретровирусный ИСД домен RRGLD⁺ LLFLK

ИС-домены белка NS1 вируса гриппа:

A/H1N1/C.-Петербург/04/09 RLE⁻ TLILLRAFT

A/H1N1/1918 RLE⁻ YLILLRAFT

TcRa CP- коровый пептид GLR⁺ ILLLKV

Рис. 8. Иллюстрация процессов внутримембранной димеризации TcR-рецепторов и их адапторных молекул [43]. **A** – общая иллюстрация организации и самосборки TcR-рецепторов в комплексе с CD3-корректором. **Б** – Структура надмембранной и трансмембранной областей компонентов комплекса TcR-рецептора. В пре-мембранной области – в структуре консервативного стебля выделены последовательно аминокислотные остатки аргинина, цистеина, цистеина и глутаминовой кислоты (вертикально – черным цветом). Красным цветом выделены аминокислотные остатки аспарагина (D) глутаминовой (E) кислоты [43]. **В** – последовательности ИС-доменов пандемического вируса 2009 (приведена структура отечественного изолята) и вируса H1N1-1918, вызвавшего «испанку», в сравнении с CP-коровым пептидом. В пептидах выделены аминокислотные остатки, имеющие отрицательный заряд – аспарагиновой кислоты (D) или глутаминовой кислоты (E). Такая структура ИСД обеспечивает взаимодействие этих доменов с «коровым» пептидом TcRa-рецептора [43]

этими остатками цистеинов переводят димер в состояние ковалентно-связанного димера. Вероятно, ковалентное связывание и взаимодействие трансмембранных фрагментов по всей длине необходимо для последующего фосфорилирования остатков тирозина в пределах тирозинсодержащего цитоплазматического домена: YxxLx6–8YxxL (см. также рис. 8).

На рис. 9 представлен общий блок моделей, иллюстрирующий отдельные события в самосборке иммунорецепторов и действие ИСД вирусов на эти процессы.

На рис. 9 видно, что активация Т-лимфоцитов зависит от образования комплексов TcR-рецепторов и их корецепторов, составляющих структурную основу сигнального ансамбля. Образование кластера рецепторов – необходимое условие быстрой активации Т-клеточного ответа (рис. 9, Б).

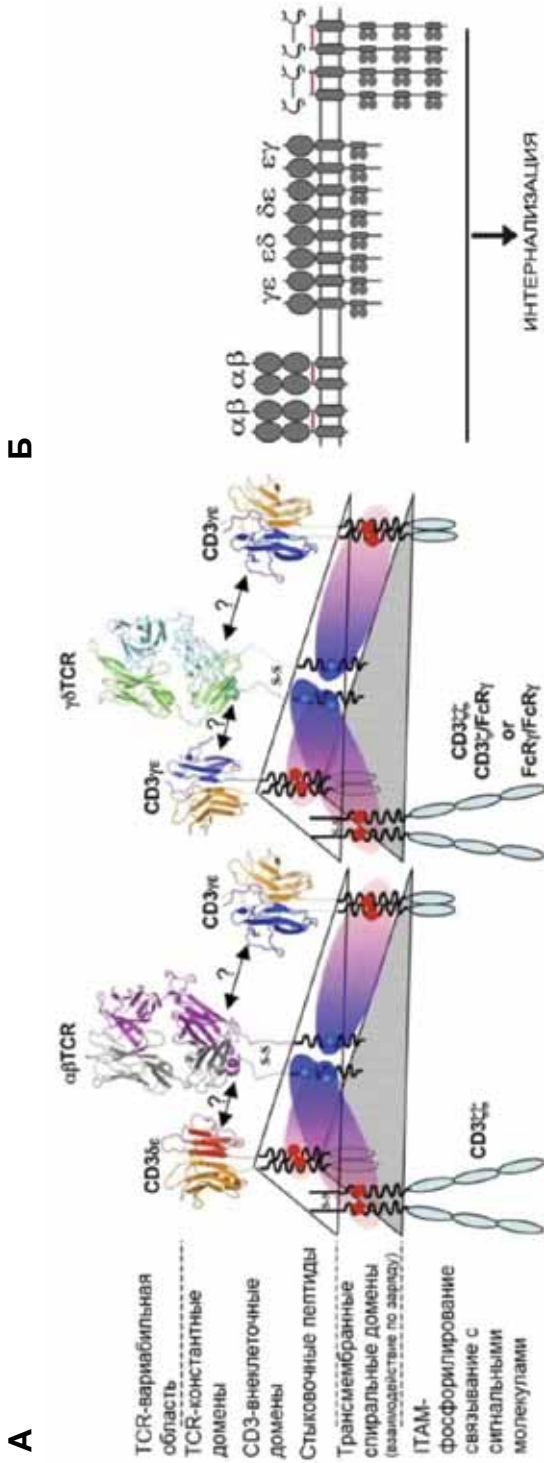
ИСД вирусов путем интеграции в мембраны (рис. 9, В) блокируют димеризацию. ИСД различных вирусов в качестве ингибиторов димеризации представлены на рис. 9, Г.

Этот уникальный механизм действия вирусоспецифических пептидов обрывает на самом начальном этапе реакцию Т-лимфоцитов на вирусные и другие антигены и блокирует распознавание чужеродных антигенов в организме. Этот механизм действия быстро реализуется в условиях активной репродукции и диссеминации вируса в организме, являясь ключевым фактором вирулентности. Исследования действия вирусов гриппа на НК-клетки существенно проясняют выбор вирусоспецифических мишеней среди иммунокомпетентных клеток [47].

Как уже указывалось, действие ИСД плацентарных синцитинов направлено на блокаду презентации антигенов плода иммунной системой материнского организма [35]. Для большинства известных вирусоспецифических ИСД установлено, что синтетические иммуносупрессивные пептиды – гомологи ИСД, и соответствующие им белковые домены блокируют активацию и пролиферацию Т-лимфоцитов через TCR α -рецепторы [6, 24].

Таким образом, механизмы иммуносупрессии при беременности и вирусных инфекциях идентичны и направлены на один спектр рецепторов [35].

Дополнительный вклад вирусов в функциональную иммуносупрессию при беременности приводит к подавлению неспецифического и специфического иммунного ответа у беременных. На рис. 10 на упрощенной схеме действия вирусов на иммунорецепторы видно, что блокада этих рецепторов включает прямое действие иммуносупрессоров на ТМД путем интеграции в мембраны. В этой схеме добавлен



Б

А

Рис. 9. Панорама иммунорецепторов и их димеров [42, 43]. А – общий вид моделей иммунорецепторов в мембране с указанием основных функциональных доменов. Трехмерными треугольниками обозначены мембраны, в которые интегрированы рецепторы. Б – кластеры CD3 – корцепторов TcR-рецептора

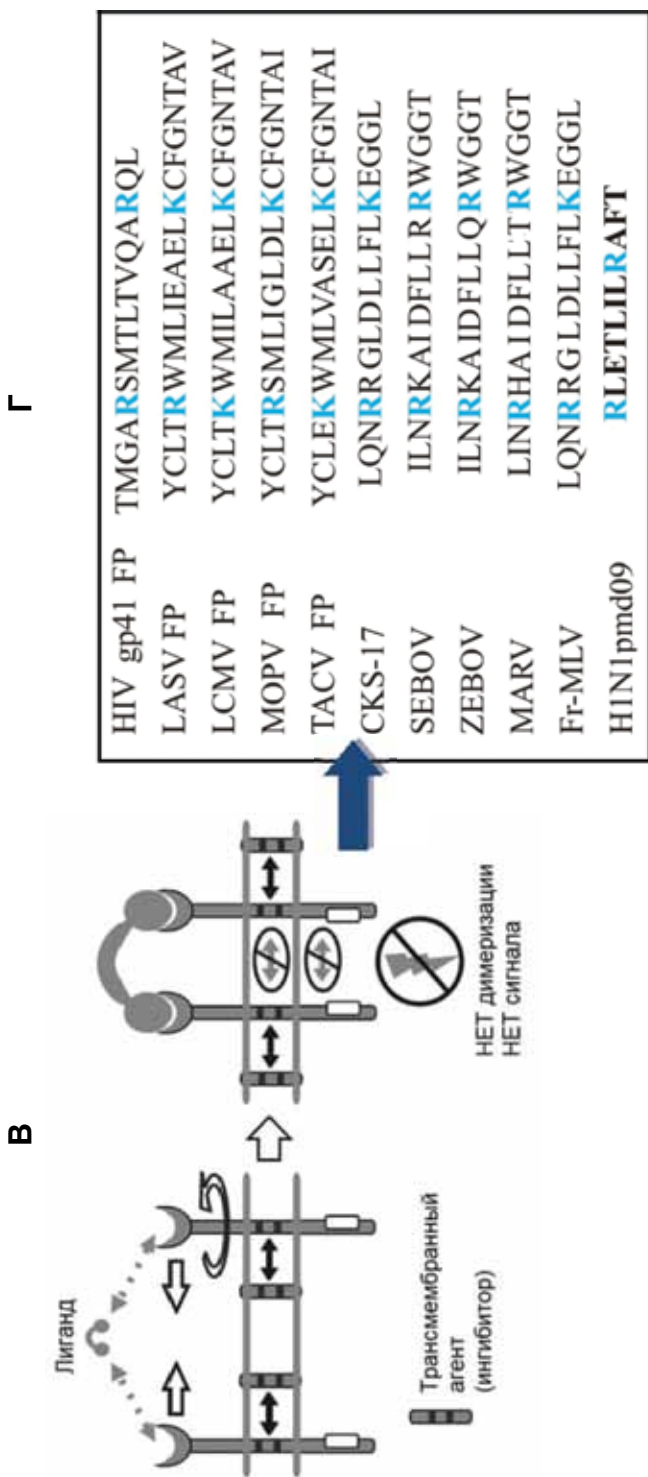


Рис. 9. Панорама иммунорецепторов и их димеров [42, 43]. **В** — действие антигена — лиганда на рецепторы — инициация димеризации и блок димеризации путем подавления ассоциации трансмембранных доменов. Ингибитор условно обозначен эллипсом с перечеркнутой стрелкой. Функции ингибитора выполняют ИСД вирусных белков и синцитинов. **Г** — первичная структура ИСД различных вирусов — блокаторов димеризации TcR-рецепторов. См. пояснения в тексте

важнейший элемент – экзосомы [32, 49]. Экзосомы – это уникальный структурный элемент клеточных эндосом, обеспечивающий транспорт и межклеточную регуляцию функций организма [47–50]. Экзосомы используются вирусами и плацентой для дистантной регуляции и контроля иммуносупрессии [50–52].

На рис. 10 представлена вирусная частица, субъединица TcR-рецептора и сигнальная субъединица CD3 – корецептора. Стрелкой внутри мембраны обозначено взаимодействие между ТМ-доменами. Интеграция вирусоспецифического иммуносупрессора в мембраны и блокада взаимодействия трансмембранных доменов представлены эллипсоидным элементом со стрелкой. Функцию слияния с клеточной мембраной выполняют экзосомы – носители иммуносупрессивных детерминант белков плаценты и вирусов [53].

В связи с пониманием иммуносупрессивной активности как важнейшего фактора патогенности пандемических вирусов гриппа существенно расширились исследования состояния Т-лимфоцитов при гриппозной инфекции [47]. Так, особое внимание в некоторых работах уделяется функциональной активности НК-клеток на моделях лабораторной гриппозной инфекции [47]. Известно, что НК-клетки играют критическую роль в элиминации вируса гриппа. В работе Гуо с соавт. [47] установлено, что вирус PR8 обладает способностью инфицировать НК-клетки. В процессе репродуктивной инфекции НК-клеток вирус гриппа значительно снижает функциональную, цитотоксическую активность НК-клеток в отношении опухолевых клеток, что коррелирует с подавлением экспрессии NCR1, NKG2D, NKpr1c, Ly49D и CD244 рецепторов. Более того, эта функция вируса связана с белком NS1. Обращает на себя внимание действие вирусной репродукции на рецептор NKG2D [47]. Для этого класса рецепторов получены наиболее строгие доказательства прямой зависимости функциональной активности от внутримембранной димеризации с участием полярных аминокислотных остатков в ТМД (см. рис. 8–9). Также следует отметить, что рецепторы NKG2D являются мишенью для плацентарных иммуносупрессоров [47]. Таким образом, действие вируса гриппа на НК-клетки совпадает с иммуносупрессивной активностью плаценты, также направленной на блокаду их функциональной активности. Совпадение этих механизмов позволяет объяснить высокую чувствительность беременных женщин к гриппу и другим вирусным инфекциям, использующим идентичный механизм иммуносупрессии [47].

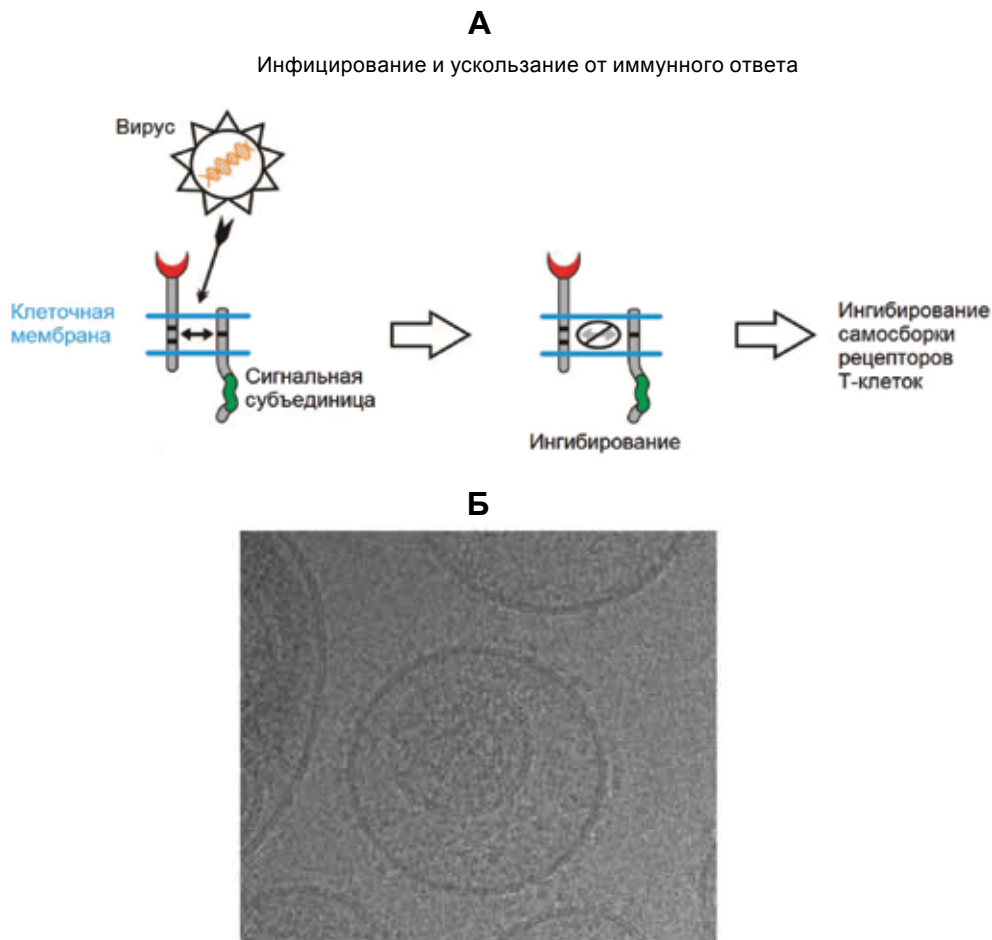


Рис. 10. Модель действия вирусоспецифических ИСД на димеризацию субъединицы Т-рецептора и сигнальной субъединицы – аналога CD3 – корецептора [32, 50–52]. А – действие вирусного ИСД – ингибитора димеризации. Б – электронная микрофотограмма экзосом – транспортных средств плацентарных и вирусных ИСД [50]

Экзосомы и плацента

Как уже указывалось ранее, в течение беременности для обеспечения толерантности мать–плод плацентой продуцируется широкий спектр иммуносупрессивных факторов [49–52]. Оказалось, что для иммуносупрессивного действия плацентой используются экзосомы [49]. Исследования, проводимые на экзосомах изолированных эксплантов плаценты, дают основания предполагать, что иммуно-

супрессивное действие плацентарных экзосом и способность к индукции апоптоза лимфоцитов свидетельствуют об их гетерогенном составе по иммуносупрессивным и апоптотическим компонентам. В частности, FasL (Fas-лиганд) оказался неосновным компонентом плацентарных экзосом, способных к индукции апоптоза клеток иммунной системы [50, 51]

В связи с этим значительный интерес представляют исследования по выявлению маркеров плацентарных экзосом. Оказалось, что кроме лигандов МНС и FasL они постоянно содержат белок TSG101 – классический маркер эндосом и постоянный участник внутриклеточного транспорта клеточных и вирусных белков [51]. Все экзосомы плаценты содержат этот маркер. Другим маркером плацентарных экзосом является фуриновая протеаза, необходимая для активации тканевых металлопротеиназ, обеспечивающих инвазию хориона в матке. Однако необходимо обратить внимание на зависимость инфекционной активности высокопатогенных вирусов гриппа *H5N1* от фуриновых протеиназ [6, 24, 30]. Распространение экзосом, содержащих фуриновую протеиназу, может существенно отягощать течение «птичьего» гриппа у беременных женщин [2].

Анализ действия плацентарных экзосом на Т-лимфоциты свидетельствует, что их иммуносупрессивное действие направлено на широкий спектр субпопуляций этих клеток, что подтверждает предположение об использовании различных компонентов репертуара, направленных на блокаду активации иммунорецепторов.

Экзосомы плаценты так же, как экзосомы других органов представляют собой нановезикулы типичной морфологии, образующиеся из эндосомных мультивезикулярных телец МВТ при их слиянии с цитоплазматической мембраной. Особый интерес для понимания механизмов иммуносупрессии при беременности представляют исследования Hedlung с соавт. [51].

В этих исследованиях установлено, что белки МНС А и В, относящиеся к комплексообразователям цепей МНС I синтезируются в плаценте, которые относятся к лигандам активированных рецепторов НК-клеток NKG2D проходят в синцитиотрофобластах внутриклеточный «сортинг» в системе везикул МВТ и выделяются из клеток путем экзоцитоза с образованием транспортных экзосом [51]. Дальнейшие исследования показали, что UL-16-связывающий белок, относящийся ко второму семейству лигандов NKG2D, также экспрессируется в плаценте. При этом подчеркивается, что экспрессия этого белка никак не связана с плацентарной инфекцией ЦМВ. Изучение внутриклеточного распределения этого белка показало, что он накапливается и задерживается в МТВ. Для исследования се-

креции двух, указанных выше лигандов использовали культивацию эксплантов тканей плаценты. В результате установлено, что белки ULBP1-5 и MIC-A и B (MHC-лиганды) выделяются из клеток в составе экзосом. Изолированные экзосомы, содержащие эти лиганды активированных рецепторов NKG2D вызывали снижение содержания этих рецепторов на NK-, CD8(+)- и гамма-дельта-T-клетках, что приводило к падению их цитотоксической активности без влияния на перфоринзависимый литический путь. Экзосомозависимый путь секреции лигандов MHC I является альтернативным путем секреции плацентарных лигандов NKG2D в отличие от синтеза растворимой формы (не связанной с мембранами) этих белков [51].

Таким образом, одной из мишеней иммуносупрессивных плацентарных экзосом являются рецепторы NK-клеток – NKG2D, что также характерно для гриппозной инфекции [47]. Детально механизмы действия иммуносупрессоров на NK-клетки описаны в отдельных статьях и монографии [6, 51–56].

Эти исследования производят впечатление настоящего прорыва в понимании механизмов коммуникаций при беременности и генерализации процессов иммуносупрессии.

Сделан вывод, что иммунная изоляция и привилегия плода обеспечивается двумя механизмами распространения иммуносупрессии, один из которых осуществляется путем выделения экзосом с иммуносупрессивной активностью в отношении NK-клеток [51]. Результаты этих исследований сразу привлекли внимание и стали предметом обсуждения механизмов защиты плода от потенциальной агрессии со стороны материнской иммунной системы [10, 51].

Наименее изученным аспектом в строении и функциональной активности экзосом является их участие в регуляции сигнальных процессов в клетках. Данные о действии плацентарных экзосом на сигнальные системы клеток свидетельствуют о необходимости в процессе беременности дистантного контроля за сигнальными процессами клеток материнского организма [51].

Однако самым поразительным является участие плацентарных экзосом в контроле экспрессии генов путем использования миРНК [53]. Авторами [184] получена библиотека малых РНК из тотальной РНК плаценты и путем секвенации выявлены миРНК, специфичные для плаценты. К специфичным для плаценты миРНК были отнесены MIR517A, относящиеся к кластеру миРНК в 19-й хромосоме человека. МиРНК секретировались клетками плаценты в форме экзосом и выявлялись в периферической крови. Анализ функциональной активности MIR517A показал, что этот класс миРНК вовлечен в

контроль систем передачи внутриклеточных сигналов фактора некроза опухолей [53].

Создается впечатление, что мы находимся только на первом этапе расшифровки кода, определяющего механизмы партитурного набора иммуносупрессоров – молекулярных элементов контроля иммунной системы презентации антигенов и развития толерантности.

IMMUNOSUPPRESSION UNDER PREGNANCY AND RISKS UNDER VIRAL INFECTIONS

O. I. Kiselev

Scientific-Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development, Russian Federation, St.-Petersbourg

The paper is devoted to studying the mechanisms of combined immunosuppression in pregnant women with influenza infection to develop arrangements for controlling these processes and for decreasing mortality from this infection. In this connection the author is dwelling on the following problems:

- How are the fetus immune privilege and tolerance development provided?
- What mechanisms do underlie the functional immunosuppression under pregnancy?
- Why are the infections especially dangerous for pregnant women?
- Is there the code of the immune system control, and do viruses use this code?

The paper deals with the problem of influence of endogenic viruses, which have penetrated the human genome more than 25 million years ago, on the great number of risks of development of various kinds of human pathologies: from infertility to pregnancy diseases; from development of malignant tumors to system pathology and autoimmune diseases.

Литература

1. Киселев О. И., Ершов Ф. И., Быков А. Т., Покровский В. И. Пандемия гриппа 2009/2010: противовирусная терапия и тактика лечения. – СПб – Москва-Сочи. ООО «А – Принт», 2010.
2. Покровский В. И., Киселев О. И. (Ред.). Грипп птиц: происхождение инфекционных биокатастроф. – Изд. «Росток». СПб., 2005. – С. 380.
3. Simonsen L., Clarke M. J., Schonberger L. B. et al. Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution // *J. Infect. Dis.* – 1998. – **178**. – P. 53–60.
4. McKinney Volkert P., Kaufman J. Fatal swine influenza pneumonia occurring during late pregnancy // *Arch. Intern. Med.* – 1990. – **150**. – P. 213–215.

5. *Harris J. W.* Influenza occurring in pregnant women // *JAMA*. – 1919. – **72**. – P. 978–80.
6. *Киселев О. И.* Беременность, иммуносупрессия, грипп и плацентарная экспрессия эндогенных ретровирусов. – Изд. «Росток». СПб. 2011, – С. 210.
7. *Jamieson D. J., Honein M. A., Rasmussen S. A. et al.* H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA // *Lancet*. – 2009. – **374**. – P. 429–430.
8. *Rote N. S., Chakrabarti S., Stetzer B. P.* The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development // *Placenta*. – 2004. – **8–9**. – P. 673–683.
9. *Mor G., Cardenas I.* The immune system in pregnancy: A unique complexity // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2010. – **63**. – P. 425–433.
10. *Muir A., Lever A., Moffett A.* Expression and function of human endogenous retroviruses in the placenta: an update // *Placenta*. – 2004. – **25**. – P. S16–S25.
11. *Noonan F. P., Halliday W. J., Morton H., Clunie G. J. A.* Early pregnancy factor is immunosuppressive // *Nature*. – 1979. – **278**. – P. 649–651.
12. *McKinney Volkert P., Kaufman J.* Fatal swine influenza pneumonia occurring during late pregnancy // *Arch. Intern. Med.* – 1990. – **150**. – P. 213–215.
13. *Hartert T. V., Neuzil K. M., Shintani A. K. et al.* Maternal morbidity and perinatal outcomes among pregnant woman with respiratory hospitalizations during influenza season // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2003. – **189**. – P. 1705–1712.
14. *Kumar A., Zarychanski R., Pinto R. et al.* Critically ill patients with novel swine origin influenza virus A/H1N1 infection in Canada // *JAMA*. – 2009. – **302**. – P. 1872–1879.
15. *Ebihara H., Takada A., Kobasa D. et al.* Molecular determinants of Ebola virus virulence in mice // *PLoS Pathog.* – 2006. – **2(7)**. – P. e73. – DOI: 10.1371.
16. *Yaddanapudi K., Palacios G., Towner J. S. et al.* Implication of aretrovirus-like glycoprotein peptide in the immunopathogenesis of Ebola and Marburg viruses // *FASEB J.* – 2006. – **20**. – P. 2519–2530.
17. *Белокриницкая Т. Е., Трубицина А. Ю., Мурикова Е. А.* Грипп А/Н1N1, осложненный пневмониями, у беременных: течение беременности, исходы для матери и плода. Материалы Всероссийской Научно-Практической конференции «Итоги эпидемии гриппа А/Н1N1». – Челябинск, 2011. – С. 7–9.
18. *Lapinsky S. E.* H1N1 novel influenza A in pregnant and immunocompromised patients // *Crit. Care Med.* – 2010. – **38**. – P. e52–e57.
19. *Thellin O., Coumans B., Zorzi W. et al.* Tolerance in the foeto-placental “graft”: ten ways to support a child for nine month // *Curr. Opin. Immunol.* – 2000. – **12**. – P. 731–737.
20. *Pereira L., Maidji E., McDonagh S., Tabata T.* Insights into viral transmission at the uterine–placental interface // *Trends Microbiol.* – 2006. – **13**. – P. 164–174.

21. *Uchide N., Toyoda H.* Antioxidant therapy as a potential approach to severe influenza-associated complications // *Molecules*. – 2011. – **16**. – P. 2032–2052.
22. *Kanellopoulos-Langevin C., Caucheteux S. M., Verbeke P., Ojcius D. M.* Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2003. – **1**. – P. 1–6. <http://www.rbej.com/content/1/1/121>
23. *Rasmussen S. A., Jamieson D. I., Bresee J. S.* Pandemic influenza and pregnant woman // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. – **14**. – P. 95–100.
24. *Киселев О. И.* Геном пандемического вируса А/Н1N1v-2009.2011. – Изд. Компания «Димитрейд График Групп®». – С. 163.
25. *Смородинцев А. А.* Гипотезы и факты о происхождении пандемических штаммов вирусов гриппа А // *Вопр. вирусол.* – 1975. – № 1. – С. 105–113.
26. *Novel Influenza A (H1N1) Virus Infections in Three Pregnant Women United States, April–May 2009* // *MMWR. Weekly*. – 2009. – **58**(18). – P. 497–500.
27. *Dubar G., Azria E., Tesniere A. et al.* French experience of 2009 A/H1N1v influenza in pregnant woman // *PLoS ONE*. – 2010. – **5**, Iss. 10. – P. e13112.
28. *Gustafsson C.* Local immune regulation in human pregnancy with focus on decidual macrophages. Linköping University Medical Dissertations. No. 1016. ISBN 978-91-85895-85-4. ISSN 0345-0082. Printed by LiU-Tryck, Linköping, Sweden, 2007.
29. *Rote N. S., Chakrabarti S., Stetzer B. P.* The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development // *Placenta*. – 2004. – **8–9**. – P. 673–683.
30. *Киселев О. И.* Химиопрепараты и химиотерапия гриппа. – СПб. Изд. «Росток», 2012. – С. 269.
31. *Sigalov A. B.* Interaction between HIV gp41 fusion peptide and T cell receptor: putting the puzzle pieces back together // *FASEB J.* – 2007. – **21**. – P. 1633–1634.
32. *Sigalov A. B.* Novel Mechanistic Insights into Viral Modulation of Immune Receptor Signaling // *PLoS Pathog.* – 2009. – **5**(7). – P. e1000404. doi:10.1371/journal.ppat.1000404.
33. *Blinov V. M.* «Dormant» immunosuppressive domains (ISD) in filoviruses: activation of «Dormant» filoviruses by endogenous retroviruses. <http://www.vector.nsc.ru/conf0999/posters/blinov/blinov.htm>
34. *Schlecht-Loufa G., Renarda M., Mangeneya M. et al.* Retroviral infection in vivo requires an immune escape virulence factor encrypted in the envelope protein of oncoretroviruses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – **107**. – P. 3782–3787.
35. *Mangeney M., Renard M., Schlecht-Louf G., et al.* Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – **104**. – P. 20534–20539.

36. *Vargas A., Moreau J., Landry S. et al.* Syncytin-2 Plays an Important Role in the Fusion of Human Trophoblast Cells // *J. Mol. Biol.* – 2009. – **392**. – P. 301–318.
37. *Kiselev O. I., Blinov V. M., Pisareva M., Grudin M.* Genomic structure of highly pathogenic influenza H5N1 virus. Identification of Ebola-like immunosuppressive domain in NS2 protein. Options for the Control of Influenza VI. Proceedings of the International Conference on Options for the Control of Influenza VI held in Toronto, Ontario, Canada / Ed. J. M. Katz. June 17-23, 2007. – P. 252–253.
38. *Cytokine storm* – reference.
39. *Coleman J. R.* The PB1-F2 protein of influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages // *Virology J.* – 2007. – **4**. – P. 9–12.
40. *Mcauley J., Hornung F., Boyd K. et al.* Expression of the 1918 influenza virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia // *Cell Host Microbe.* – 2007. – **2**. – P. 240–249.
41. *Киселев О. И.* Пептиды – комплексоны иммуносупрессивных доменов вирусных и клеточных белков. – Заявка на изобретение. 2012.
42. *Amon M. A., Manolios N.* Hypothesis: TcR signal transduction – A novel tromodular signaling system // *Mol. Immunol.* – 2008. – **45**. – P. 876–880.
43. *Call M. E., Pyrdol J., Wiedmann M., Wucherpfennig K. W.* The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex // *Cell.* – 2002. – **111**. – P. 967–979.
44. *Call M. E., Schnell J. R., Xu Ch. et al.* The Structure of the $\zeta\zeta$ Transmembrane Dimer Reveals Features Essential for Its Assembly with the T Cell Receptor // *Cell.* – 2006. – **127**. – P. 355–368.
45. *Call M. E., Wucherpfennig K. W.* Common themes in the assembly and architecture of activating immune receptors // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – **7**. – P. 841–849.
46. *Call M. E., Wucherpfennig K. W., Chou J. J.* The structural basis for intramembrane assembly of an activating immunoreceptor complex // *Nat. Immunol.* – 2010. – **11**. – P. 1023–1029.
47. *Guo H., Kumar P., Moran T. M. et al.* The functional impairment of natural killer cells during influenza virus infection // *Immunol. Cell Biol.* – 2009. – **87**. – P. 579–589; doi:10.1038/icb.2009.60.
48. *Warning J. C., McCracken S. A., Morris J. M.* A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction Rev.*, DOI: 10.1530/REP-10-0360. ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899 (online) Online version via www.reproduction-online.org
49. *Taylor D. D., Gercel-Taylor C.* 1141420984 Placental exosome suppression of T cell activation and differential target of T cell subsets // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2006. – **55**. – P. 401–402. doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00383_26.
50. *Taylor D. D., Akyol S., Cicek Gercel-Taylor C.* Pregnancy-Associated Exosomes and Their Modulation of T Cell Signaling // *J. Immunol.* – 2006. – **176**. – P. 1534–1542.
51. *Hedlund M., Stenqvist A. C., Nagaeva O. et al.* Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate

- receptor expression: evidence for immunosuppressive function // *J. Immunol.* – 2009. – **183**(1). – P. 340–351.
52. *Chamley L.* F1000 Women's Health. 29 Jul 2009. New Finding.
53. *Luo S.-S., Ishibashi O., Ishikawa G. et al.* Human Villous Trophoblasts Express and Secrete Placenta-Specific MicroRNAs into Maternal Circulation via Exosomes // *Biol. Reprod.* – 2009. – **81**. – P. 717–729. DOI 10.1095/biolreprod.108.075481.
54. *Guo H., Kumar P., Malarkannan S.* Evasion of natural killer cells by influenza virus // *J. Leukocyte Biol.* – 2011. – **89**. – P. 189–194.
55. *NKG2D* and its Ligands. www.rndsystems.com/mini_review
56. *González S., Groh V., Spies T.* Immunobiology of Human NKG2D and Its Ligands // *CTMI.* – 2006. – **298**. – P. 121–138. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006.

INDIVIDUALIZATION OF CANCER TREATMENT: CONTRIBUTION OF OMICS TECHNOLOGIES TO CANCER DIAGNOSTIC

Serhiy SOUCHELNYTSKYI

*Department of Oncology-Pathology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden;
AHTeC, Uppsala, Sweden;
Address for corresp.: Z5:02, KS, Solna, SE-17176, Stockholm, Sweden;
e-mail: serhiy.souchelnytskyi@ki.se*

Cancer is a disease, which explicitly illustrates success, failures and challenges of the modern biomedical research. Technology development has been the driving force of improvements in the cancer treatment. Introduction into clinical practice of genomics, RNA profiling and proteomics technologies has provided a basis for development of novel diagnostic, drugs and treatments. In this chapter, contributions of OMICs technologies to personalization of cancer diagnostics and treatment are discussed. The focus is on technologies that showed capacity to deliver diagnostics that may be used in the clinic as routine tests. Three clinical cases are presented to illustrate already available individualized cancer diagnostics.

1. Why OMICS technologies are needed for treatment of cancer?

Cancer still kills people. It was easier to send a man in the outer space or to the Moon, than to improve survival of patients having advanced and metastatic cancers. This highlights complexity of cancer as a disease, which is apparently much higher than to build and launch a space rocket. Carcinogenic transformation of cells is accepted as the main cause of cancer [1–4]. Carcinogenic transformation is defined as a number of changes in the cell physiology, which lead to expansion of malignant cells in the body, corrupting the normal physiology, and ultimately killing the person.

The key conclusion of more than 50 years of intense studies is that the collected knowledge has not reached the critical mass required to find a cure against cancer. The oncogenes and tumor suppressor model has been a great step forward [1–4], but it is clear today that carcinogenic transformation of cells is the result of interaction of hundreds of molecules. Out of the hundreds of these cancer-promoting genes, RNAs, proteins and

Abbreviations: MPS, massive parallel sequencing; NGS, next generation sequencing; FISH, fluorescence in situ hybridization; CGH, comparative genomic array; ChiP, chromatin immunoprecipitation; PCR, polymerase chain reaction; ABPP, activity-based proteome profiling; NMR, nuclear magnetic resonance; FMDx, functional molecular diagnostic; MS, mass spectrometry.

metabolites many are the same as they are in the normal cells. It is their corrupted activity, mis-localization, and misplaced interactions that make them tumor-promoting (Fig. 1). This confusion has only underlined the complexity of cancer.

A solution to the complexity problem has been proposed by introduction of technologies for comprehensive study of carcinogenesis. These technologies focused on studies of genomic DNA (genomics), RNAs (transcriptomics), proteins (proteomics) and metabolites (metabolomics) [5–7]. Historically, introduction of nucleotide microarrays to study expression of RNA was the first strong contribution to the comprehensive exploration of carcinogenesis [8]. Development of the microarrays was possible due to successes of technologies for synthesis of oligonucleotides and production of cDNA on a large scale and in automated way. A chip-printing technology was another component of the success. Development of sequencing technologies, especially of massive parallel sequencing, has given boost to comprehensive studies of genome for the clinical diagnostics [9]. Comprehensive studies of the proteome are still waiting for a wide use of intact protein analysis technology. Current technologies of mass spectrometry, 2D

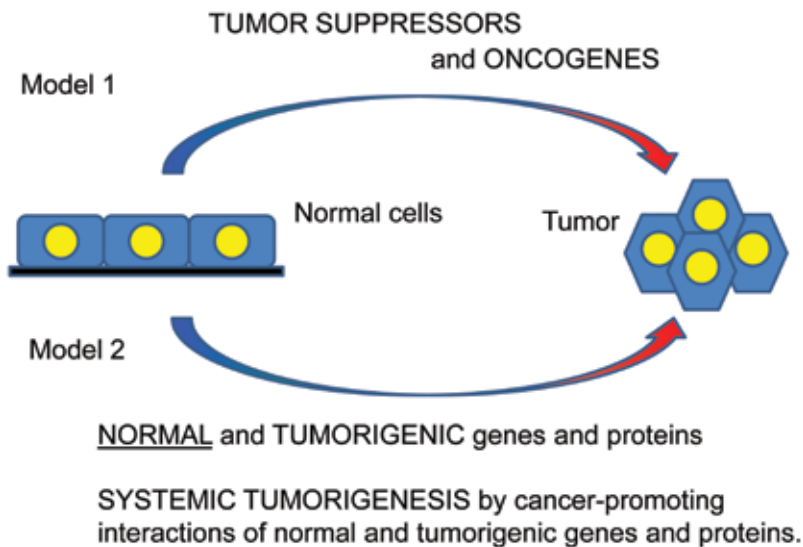


Fig. 1. Two models of tumorigenesis. The first model explains tumorigenesis by involvement of tumor suppressors and oncogenes (upper part). The second model explains tumorigenesis as a systemic effect of normal and tumorigenic genes and proteins (lower part). The difference is that the systemic tumorigenesis model postulates that even normal genes and proteins may contribute to tumorigenesis, if their interaction networks shift from the normal physiological reactions to the disease promotion

gel and other electrophoresis, or liquid chromatography are not providing quality that is required for full description of the human proteome [10, 11]. However, the situation may change with introduction of ZP-technology [12]. The least developed of the OMICs technologies is metabolomics. The high variability of physico-chemical and structural properties of the metabolites makes it challenging to detect and identify all metabolites by a single technology. Despite all shortcomings, OMICs studies have become essential for success in treatment of cancer, due to their ability to the comprehensive analysis. Therefore, there is no alternative to development of fast, reliable, informative and cost-efficient OMICs technologies for diagnostics and treatment of cancer.

2. Genomics

Since the discoveries that the genomic DNA carries hereditary information, and is the white-print of the most of the living creatures, study of genes or genomics, has been a subject of intense developments. This excitement was translated in a slogan that “cancer is the disease of genes”. The slogan’s correctness is questionable today, as the non-genomic mechanisms may have a strong impact on tumorigenesis. How many genes do humans have? What is the structure of these genes, as introns and exons? What type and how many mutations are in the genome of a given patient? What are epigenetic changes in the genes? All these questions have importance for understanding carcinogenesis, and subsequently for treatment of cancer.

Technologies for studies of genome, which may have a value for clinical applications are discussed in this section (Fig. 2). These technologies have been developed to the extent that they may be applied in the clinic for diagnostics, selection of treatment and monitoring of a patient’s response.

2.1. Massive parallel sequencing (MPS/NGS)

The excellent research on biochemistry of DNA paved the way to development of DNA sequencing techniques. The first generation DNA sequencing methods are Maxam-Gilbert fragmentation and Sanger’s dideoxy base-termination techniques [13, 14]. However, these techniques in their original forms were too cumbersome for being used in the clinical practice. The step toward clinic was by introduction of automated sequencers [15]. Automation allowed detecting gene mutations of the clinical importance. However, it was still far from a comprehensive analysis of the whole genome of a patient in the routine clinical practice. Faster and affordable methods were needed, and they come with development of massive parallel sequencing (MPS), known also as the next generation sequencing (NGS).

MPS is based on parallel sequencing of short fragments of DNA, which are then aligned to produce gene sequences (Fig. 2A). The size of

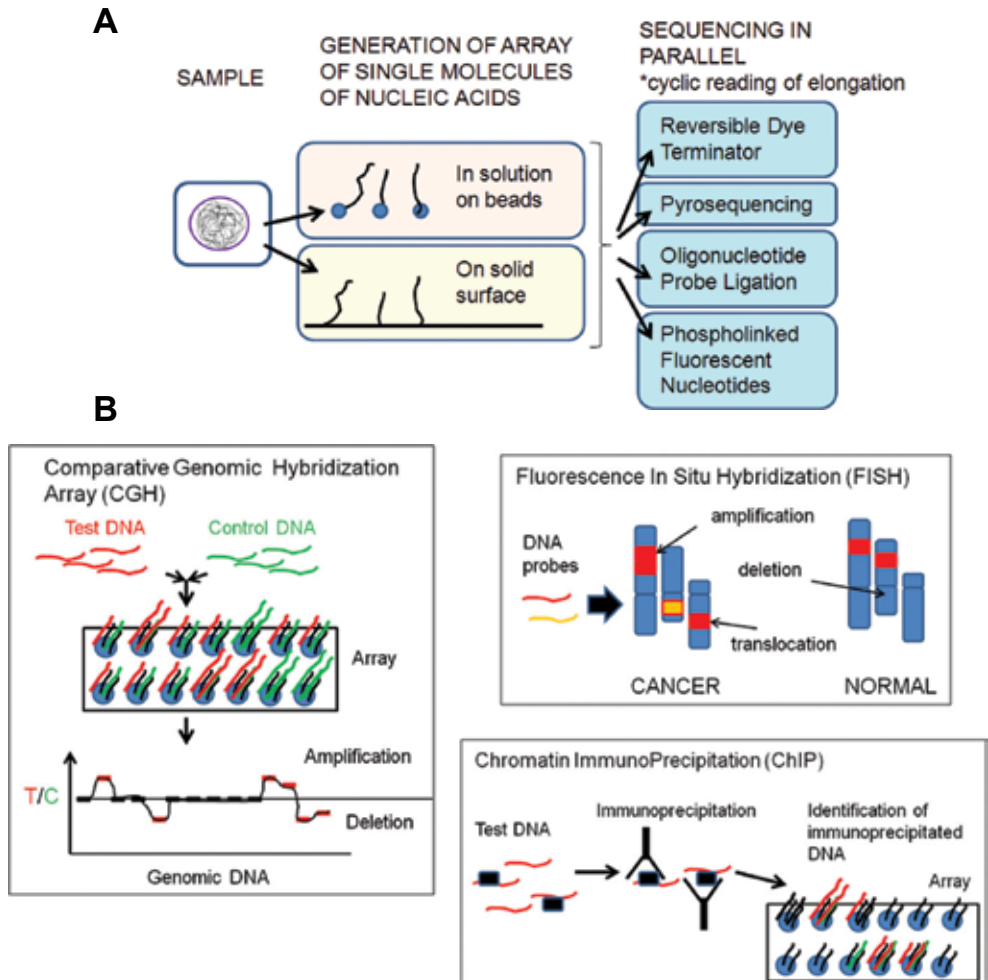


Fig. 2. Presentation of genomics and transcriptomics technologies that may be used in clinical diagnostic. A) Massive parallel sequencing technologies. Two main parts of MPS are indicated. The first is preparation of nucleic acids for sequencing reactions. This is done by preparing single molecule suspensions, or by anchoring nucleic acids to a solid surface. The second part is enzymatic reactions to read the sequence. The reactions include polymerase or ligase reactions, and the sequence reading is by detecting incorporation of defined nucleotides which are added to the reaction in cycles. B) Schematic presentation of CGH array, FISH and ChIP technologies. Amplifications or deletions of genomic DNA are detected by CGH arrays as increased or decreased relative signal of the test DNA in comparison to the control normal DNA. Binding of specific DNA probes to the chromosomal regions in FISH assays indicate regions of amplifications, deletions and translocations. For ChIP, immunoprecipitation of specific regions of DNA allows detection and profiling of only these regions, for example detection of transcriptionally active regions, or DNA regions interacting with specific proteins, or epigenetically silenced regions

sequenced fragments is from 30 to 700 bases, depending on the sequencing method and instrumentation [16, 17]. This relatively short length of the sequenced fragments imposes limitations on the quality of definition of the complete genes sequence.

MPS has been used successfully for analysis of mutations in genes, with the emphasis on the exon analysis. Focus on exons allows generation of data which could be used in clinical diagnostics within relatively short assay time. As an example, the full exon sequencing and detection of the mutation profile of a tumor cells may be completed within 30 days [18, 19]. The second example is the contribution of MPS to profiling of mutations in different sub-types of cancer, providing insights into molecular heterogeneity of tumors [19]. Understanding this heterogeneity is essential for development of personalized treatment of patients. The expectation is that MPS will become a standard and routine examination of cancer patients. The nearest years will show whether this expectation will indeed be realized in better treatment of patients.

2.2. CGH, PCR, FISH and ChIP tests

Pre-MPS era had given rise to a number of methods to assess structure and mutations of the genes (Fig. 2B). Comparative Genomic Hybridization Array (CGH) was used to detect gene aberrations on the whole genome level [20]. However, the resolution power of CGH arrays has been in the range of 5 kB to 0.2 kB, and variations in the gene structure have been the core information delivered by CGH [20].

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is used to detect rearrangements of selected genes, e.g. deletions, amplifications and translocations [21, 22]. Clinical application of FISH is limited by its low number of monitored DNA fragments, and relatively large work-load for performing the test. Multiplexing FISH by using different probes with different detection wavelength, and use of nano-devices to minimize and automate the test are 2 developments which make FISH still useful in the clinical diagnostic [21, 22].

Polymerase-chain reaction (PCR)-based analysis of the genomic DNA is used less and less in the clinical diagnostics. The niche for PCR has become analysis of pre-selected mutations [23]. However, PCR is more used for analysis of RNAs than genomic DNA. Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP) has proven the high informative value in studies of chromatin re-arrangements and methylation of the genomic DNA [24]. Therefore, the unique information which may be delivered by ChIP tests is the profile of epigenetic changes in the genome. On the other hand, complexity of the ChIP tests limits its clinical applications.

Complexity and low automation level of the CGH array, FISH, PCR, and ChIP tests are major hindrances for their use in routine clinical diagnostics (Fig. 2B). Cost efficiency of these assays is also lower, as compared to tests with the recent developments of MPS. Therefore, each of the genome profiling technologies will have their niches. MPS will with high probability dominate the whole genome profiling, while CGH, FISH, PCR and ChIP tests will focus on selected genes and genome areas.

3. Transcriptomics

Historically, mRNA profiling by expression arrays has been the first true OMICs technology. The ground of this technology was laid by excellent works on the biochemistry of oligonucleotides and generation of cDNA. PCR-based analysis of mRNA expression was competing with the RNA expression arrays, but PCR was inferior due to the higher complexity and lower robustness. mRNA profiling has also been proposed for the clinical diagnostics. However, the arrival of the massive parallel sequencing technologies has given the real boost to RNA profiling by providing flexibility, speed and additional information about mRNA, microRNAs and long non-coding RNA, e.g. expression and mutations [25].

3.1. Massive Parallel Sequencing of RNAs

MPS technologies used for profiling of RNAs are similar to those used for profiling genomic DNA, but the focus is on mRNA, siRNA/miRNAs, and lncRNA. The difference is only in preparation of samples for analysis [26–29]. RNAs are more sensitive to degradation, located in nuclei and cytoplasm, and have different sizes as compared to the genomic DNA. These features make challenging MPS of RNAs, as variability in quality of the samples would be reflected in discrepancies of produced data. Despite the challenges, information delivered by MPS of RNAs allows a better insight into molecular activities in the tumors. A number of examples confirmed the value of RNA MPS for making clinical decisions [30, 31]. For example, MPS sequencing of RNAs in tamoxifen-resistant breast cancer cells identified 1728 RNAs associated with the resistance. This number of the affected RNAs indicates that the acquisition of the tamoxifen resistance is a complex process with involvement of many activities. On the other hand, this study opens for better monitoring of the resistance, and that is most important, it provides the basis for selection of more efficient treatment by combined blocking of the key RNA-related regulators of the resistance [31].

3.2. Expression arrays

RNA expression arrays are undergoing evaluation of their use in the clinical diagnostic. Only 5 years ago, RNA expression arrays were at the leading edge of entering clinical diagnostic. The limitation at that time was not in the technology itself, but in applicability of the generated information for diagnostic and making decision about treatment. While measuring expression of RNA provided large volumes of information for research purpose, this information was difficult to translate into diagnostic and prognostic values. The reasons were discrepancies between mRNA expression and expression and activity of the corresponding proteins. Another critical limitation was not sufficient robustness of the arrays. As an example, RNA microarrays from different suppliers could produce different detection values for the same RNAs [32].

The niche for RNA expression arrays is changing from the all-gene coverage approach to measuring a set of RNAs of importance for specific type of cancer or a set of cancer drugs. Such arrays are combined now with dedicated systems biology tools to extract disease-relevant information. For example, the arrays have been used to identify long non-coding RNAs associated with breast cancer [33]. MicroRNA arrays are another novel niche-approach that may be the way to discover cancer-associated microRNAs [34].

3.3. PCR-based analysis

PCR-based RNA analysis is in the situation similar to RNA expression arrays. Notably, PCR-based analysis is not anymore considered for a comprehensive full-transcriptome screening of RNA expression. PCR-based analysis is currently used for measuring defined sets of up to 100 different RNAs, predominantly mRNAs. For example, focused analysis of expression of the key genes involved in acute myeloid leukemia unveiled 19 up-regulated and 25 down-regulated genes [35]. An important advantage of the PCR-based assays is their technical simplicity. Such assays may be used even in a small size laboratory, and for the low cost. Introduction of companion diagnostics into clinical practice also contributes to the niche-development of PCR-based tests. As examples, PCR-based tests of mutations in BRAF, EGFR, BCR-ABL, PDGFRs and MEK1 genes are proposed to the clinic as companion diagnostics of drugs acting on these kinases [36, 37].

Thus, MPS technologies have begun to dominate a comprehensive RNAs profiling, while RNA expression arrays and PCR-based assays are specializing in measurements of pre-selected sets of RNAs. It should be noted that the recent developments of systemic analysis tools have strongly

contributed to extraction of information useful for clinical diagnostics, prognostic and selection of treatment.

4. Proteomics

All known anti-cancer drugs act directly on proteins or require proteins for their activity [38]. This makes proteomics essential for diagnostics and selection of treatment. Early approaches of monitoring expression of the drug targets have shown their positive contribution to cancer diagnostic and treatment. Such approaches are currently a standard of routine diagnostics, and are applied overwhelmingly by using immunohistochemistry (IHC). Measurements of the expression of Her2, EGFR, ER, PgR in tumors by IHC are standards when an oncologist has to decide about use of Herceptin, Iressa, or antihormonal therapy [39]. The drawback of such approaches is in the limited number of measurements, as a single assay measures only one protein. That is why a comprehensive profiling of the whole proteome has been expected to improve diagnostics. As the minimum, the clinical oncologists need to evaluate a drug target itself, and all proteins which may affect drug efficacy [40]. This requires to measure in a single assay up to thousands of proteins. This is why proteomics experiences strong pressure to deliver good diagnostic tools.

Proteomics technologies may be classified on the basis of what they study, e.g. proteins, peptides or epitopes, how they separate the analytes, and what they detect to identify proteins. Studying proteins or their products peptides, or protein epitopes, are the main cut-off points for deliverables of the proteomics technologies (Fig. 3). Peptidomics approaches by the Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) have recently been popular [41, 42]. However, LC-MS/MS is not capable of detecting and identifying the intact proteins and their isoforms. Therefore, there were too low correspondence of claimed identification of proteins, and the real impact of these results on the clinical diagnostics [42]. 2D gel electrophoresis (2D-GE) has been the technology to study intact proteins [43–45]. However, 2D-GE has limited protein separation capacity. Novel intact-protein proteomics techniques have been under development [12, 43]. The protein arrays are considered of being closest to enter routine clinical diagnostics. Proteomics has also other technologies for separation and identification of proteins, which are too laborious to be used in clinic. Therefore, in this section I focus on proteomics technologies which may have an impact on the clinical diagnostics, intact-protein proteomics, peptidomics and protein arrays (Fig. 3).

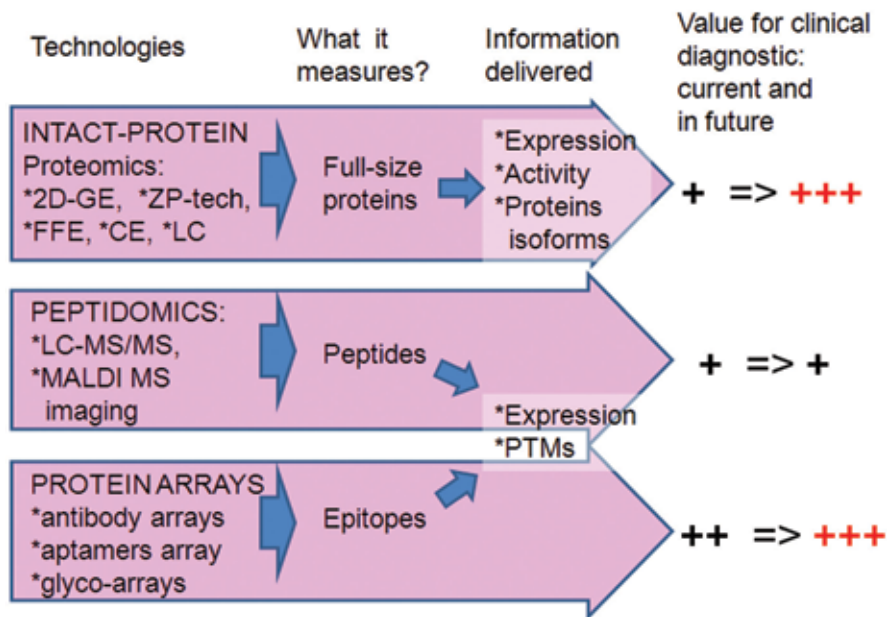


Fig. 3. Proteomics technologies that may be used in clinical diagnostic. Proteomics technologies to study intact proteins, peptides and protein epitopes are indicated. What these technologies measure, and type of delivered information are mentioned. Pluses indicate current and expected in the nearest years levels of application of the technologies in the routine clinical diagnostic

4.1. Intact-protein proteomics

The key feature of the intact-protein proteomics is that the studied analytes are proteins. Therefore intact-protein proteomics is the most informative profiling of the proteome among all proteomics technologies. Despite such importance, technologies of the intact-protein proteomics have not had capacities to describe the whole proteome. Variability of physico-chemical properties of proteins has been the main barrier.

2D-GE has been the most common technique of the intact-protein proteomics. Classical 2D gels may separate up to 5,000 proteins in one gel. pH zoom-in gels were reported to separate between 7,000 and 10,000 proteins [43–46]. Recently developed ZP-technology may be the breakthrough of the intact-protein proteomics, with its capacity to separate more than 20,000 proteins in a single run [12]. Separated proteins have to be identified, and today the best identification technique is mass spectrometry. MALDI TOF mass spectrometry has been successfully used in combination with 2D gels.

2D-GE and ZP-technology have been used for cancer diagnostic in the clinic (see examples in the section #6 below). However, these techniques are rather labor intensive, and are not enough well automated for routine use in a clinical diagnostic laboratory. The use of these techniques has been in the translational cancer research, and in managing a limited number of patients. To be suitable for use in the routine clinical diagnostics at a large scale, an instrument with fully automated manipulations would be required. For the moment, all attempts to create such an instrument have not been successful.

Other techniques employed in the intact-protein proteomics are free-flow electrophoresis, capillary electrophoresis and liquid chromatography [46–49]. However, none of these techniques is capable of detecting all proteins of the human proteome, and providing sufficient separation of even those proteins that were detected. Significant efforts have been invested in development of protein mass spectrometry. However, mass spectrometry is unlikely to succeed in analysis of full-length proteins due to limitations of the ion optics and physical properties of sub-atomic particles. Therefore, significant developments should be made to prove that these techniques have a future in the clinical diagnostics.

The intact-protein proteomics has another advantage over other proteomics technologies, as it allows unbiased analysis of protein activities. For example, it allows the detection of all kinases which may be inhibited by a tested kinase-inhibiting drug [50]. The comprehensiveness of the tests means that it would be analyzed not only intended target of the drug, but also all kinases in the tested tumor. This provides information about efficacy of the drug, and about potential off-target and side-effects. Among other activities which can be tested by the intact-protein proteomics, there are acetylation, ubiquitylation, PARylation, proteolysis, and glycosylation [51]. Taking into account introduction in the clinical practice drugs affecting these post-translational modifications, the diagnostic value of the intact-protein proteomics is going to increase.

4.2. Peptide-based proteomics

Peptide-based proteomics is strongly associated with use of mass spectrometry [41, 42]. The focus of mass spectrometry on peptides is because of two limitations. The first limitation is due to biochemistry of proteins, and the second is due to the physics of ions and sub-atomic particles. The biological limitation is because of the enormous complexity of the mass spectrum of an intact protein. Many combinations of isotopes distribution in an intact protein, and multiple charge ionizations of the protein make it challenging to obtain a well defined protein spectrum of the high resolution. On top of that, if there is a mixture of proteins with the molecular

masses in the same range, separation of these proteins by mass spectrometry would be very difficult to achieve. The physical limitation is imposed by changing mass values of proteins in different conformations and as polymers. Atomic interactions change the total energy of the protein as compared to the sum of masses of the amino acids. The energy change is relatively low for peptides, and it does not have a significant effect on the mass value of the peptide. However, for the molecules of mass higher than 20,000 daltons, the change of energy may be in the range of 900 MeV. This may be translated in the mass change corresponding to more than 0.7 dalton, as 1 atomic mass unit is equal to 931,49 MeV. Such uncertainty of the mass of large molecules makes irrelevant applications of the high resolution mass spectrometry. What is the reason to rely on the resolution of less than 0.001 dalton, if the uncertainty of masses due to the large size of the intact proteins is of more than 0.7 dalton?

However, mass spectrometry has a potential to be used in the clinical diagnostics. The niche of mass spectrometry-based diagnostics is in measurements of a limited set of peptides, which then would serve as biomarkers. The types of peptides to be measured define type of mass spectrometry technology. For example, MALDI TOF mass spectrometry is used to detect peptides ionized from a tumor section [52]. While detection of the peptides flying in the instrument is rather robust, the challenge is to control ionization of the peptides. Variations in ionization are due to differences in composition of the tissue in its different areas, thickness of the section, and slightest differences in application of the matrix. Variable ionization efficiency generates false differences in distribution of the measured peptides in the tissue. Proposed solutions with using internal controls may help to overcome the ionization problem, but it will complicate the technology. Such a complication would have a negative impact on the clinical applications of MALDI MS imaging. Other issues of MALDI MS imaging are technical problems of the size of the laser beam, speed of the spectra acquisition, and processing of the collected data [52]. Taken together, they show that MALDI MS imaging is not yet ready to enter routine clinical diagnostics.

However, when peptides are the biomarkers, mass spectrometry may be the method of choice. As an example, the detection of peptides in brain may have a diagnostic value [53]. With controlled sample preparation methods and internal MS standards, mass spectrometers may become standard equipment in the clinical laboratory. In 2013, the cost of a good quality mass spectrometer is affordable for specialized diagnostic laboratories. Another important initiative is generation of the Peptide Atlas, which provides peptides that may be used as internal standards [54]. When such peptides are added to the samples, it provides a reference of the quality of

analyte detection, and for the quantification of the marker peptide in the sample. Thus, peptide-based proteomics is dominated by mass spectrometry, and may be used in diagnostics based on the detection of peptides as markers.

4.3. Protein arrays

Among all proteomics technologies, protein arrays are the most advanced on the way into routine clinical use. Protein arrays measuring expression of a defined set of proteins are the most probable candidates for the routine diagnostics [55–57]. The protein array technology is well developed, and it has been extensively tested. To generate a protein array, it is required to select names of proteins and epitopes to be detected. Generation of capturing agents, e.g. primary antibodies, detection reactions, e.g. secondary antibody and a signal generation system, and selection of a format for the array – all these steps can be done with the already available and robust methods.

Thus, the strong side of protein arrays is the well established technologies and knowledge of the targets to be measured. The weak side is the need to ensure stability and specificity of the capturing molecules, e.g. antibodies. Another weak side of the protein arrays is the lack of unbiased analysis. With the arrays, one gets an answer only to questions about pre-defined proteins. If there is an off-target effect, it would be difficult to identify it with the arrays. Therefore, protein arrays may be a great tool for companion diagnostics, when measurements of up to 100 targets are required for diagnostic.

5. Metabolomics: mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry

Metabolome represents very diverse set of chemical compounds in the human body. Nucleic acids and proteins have single polymeric structures of nucleotides or amino acids, respectively, even if the monomers may be quite diverse. However, metabolites are much more diverse as chemical structures. Metabolites are different types of polymers, e.g. glycans and lipids, and non-polymeric low molecular weight organic and inorganic molecules [58, 59]. This chemical diversity of metabolites creates a big challenge for their comprehensive analysis.

On the other hand, metabolomics keeps promise of being of high importance for diagnostics. Robust metabolome profiling of patients would contribute to prediction of drug pharmacokinetics, and response of the body to treatments. Metabolic syndrome and metabolic insufficiency are among the most serious complications in treatment of cancer. Metabolome

profiling would provide a tool to predict response to treatments, and therefore takes its part in the clinical diagnostics.

Nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry are two techniques which dominate in studies of metabolites [58–60]. However, none of these techniques have yet capacity to be incorporated in the routine clinical practice. NMR has the best efficiency in identification of metabolites, but sensitivity has not been sufficient for application of NMR to small quantities of clinical samples. Notably, the quantities of metabolites in clinical samples are estimated at the picomolar level, while NMR requires micromolar quantities [58–60]. Mass spectrometry has higher sensitivity, but the drawback is in identification of ionized metabolites. Ionization degree and stability, or rather instability, of metabolites upon ionization limits coverage and identification of metabolites, and therefore application of mass spectrometry [58, 60]. The physical principles of NMR and MS, and the physico-chemical features of metabolites suggest that NMR may take the lead. This is because physics of NMR allows enhancing sensitivity, and it may pave the way to the breakthrough in metabolome-based diagnostics.

6. Integration of OMICs technologies in personalized cancer diagnostics: examples of applications

Clinical OMICs technologies are at different stages of development, and therefore deliver results of different quality. For diagnostics, the quality is defined by the type of measured analytes, comprehensiveness of the coverage of all analytes, sensitivity of detection, suitability of primary data for an analysis, and ability to deliver results to support diagnostic and selection of treatment. In this section, I would like to give examples of how OMICs technologies may help in management of patients.

When a patient arrives to a Hospital, a decision is to be made about type of diagnostics to be applied. The samples for diagnostics may be blood and/or tumor biopsy as a surgically resected tumor or as a needle biopsy. The blood is used for preparation of circulating tumor cells (CTC), immunological tests, and use of the blood cells for mutation analysis of selected genes. The tumor material is used for preparation of an organ culture, primary tumor cells, and for biochemical tests.

Functional Molecular Diagnostics (FMDx) evaluates responsiveness of individual patient's tumors to different drugs by testing responsiveness of the living tumor samples in organ culture (Organ Culture FMDx), testing targets and modulators of the drugs' action (Functional Biochemical Assays), and by unbiased testing of the tumor's proteome profile (Proteomics FMDx). These assays measure in a real time how the patients' tumor

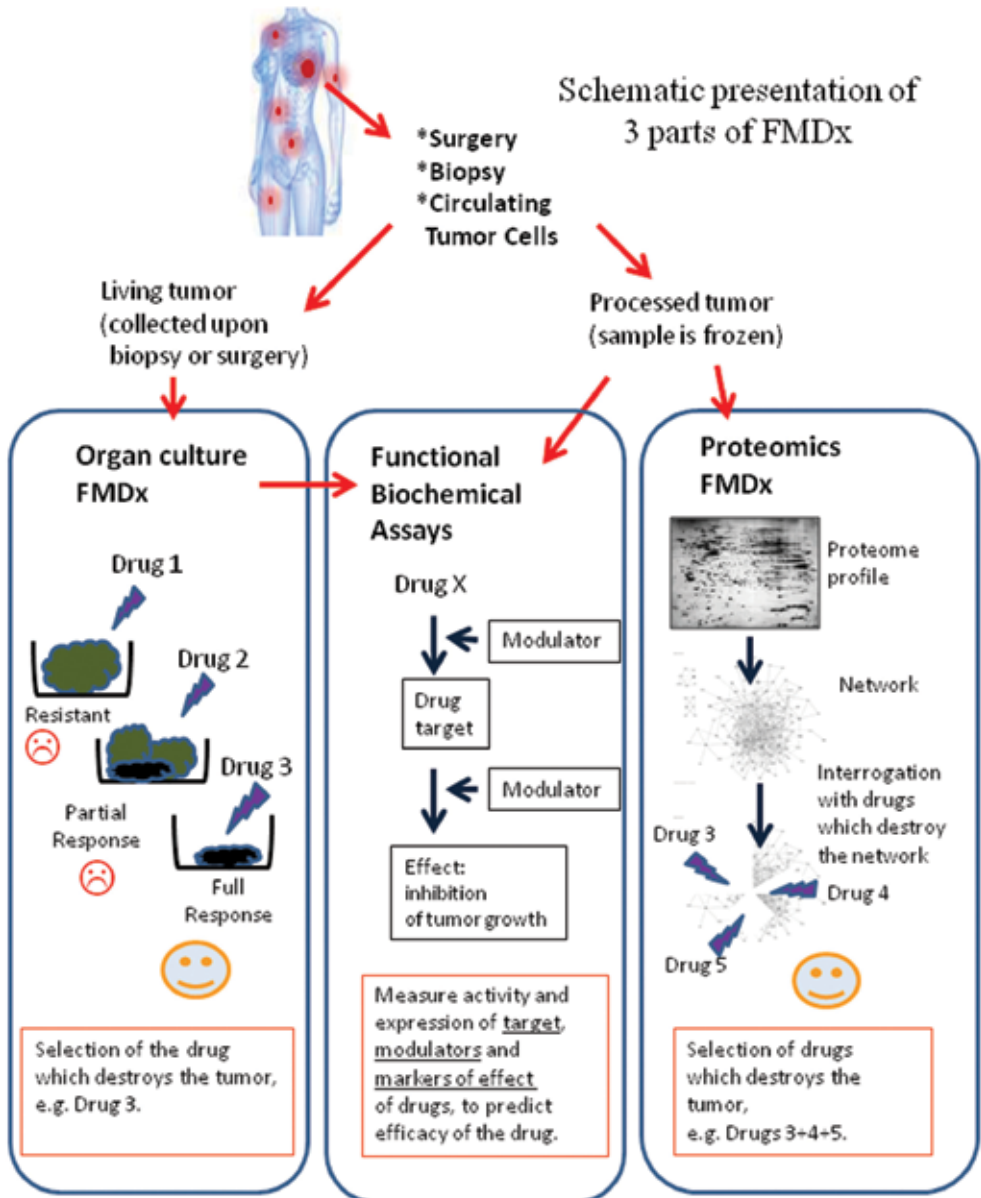


Fig. 4. Overview of Functional Molecular Diagnostic. The 3 components of FMDx are presented. The components are Organ Culture FMDx, Functional Biochemical Assays and Proteomics FMDx. Organ Culture FMDx is performed with living tumors, and evaluates sensitivity to drugs. Functional Biochemical Assays are used to evaluate mechanisms and efficacy of the drugs. Proteomics FMDx allow unbiased analysis of the molecular profile of the tumor, including diagnostic, prediction of tumor aggressiveness, and selection of drugs acting on the tumor

may respond to different drugs before the patient is offered treatment, and whether the tumor is of an aggressive type (Fig. 4).

In this section, examples of diagnostic with the use of OMICs technologies are presented. The Functional Molecular Diagnostic (FMDx) was developed to help oncologists in diagnostics and selection of treatment. FMDx consists of a number of tests to evaluate a molecular profile of a tumor, predict development of the disease, and select treatment tailored to the patient. The presented here examples describe 3 clinical cases. For the reason of the patients' integrity, no personal details are provided. The descriptions are to illustrate how OMICs technologies were integrated in the diagnostic efforts.

Case 1. Personalization of treatment with Proteomics FMDx

A lump was detected in both breasts of a woman. The lumps were removed surgically. No spreading to the lymph nodes, and no metastases were detected. The question of the oncologists was whether these 2 tumors were related, i.e. primary tumor in one breast and metastasis in the other, what is prediction of aggressive development of the disease, and which drugs would be most suitable for this woman.

The aliquots of the lumps were prepared for the proteomics study, by extracting proteins and performing proteome profiling (Fig. 5). 2D gel electrophoresis and mass spectrometry were used for generation of the proteome profiles of the tumors. The intact-protein proteomics was applied, which allowed detection of multiple isoforms of the tumor proteins. MALDI mass spectrometry was used to identify proteins, and the systems biology was used to build a network of relations between the tumor-related proteins. The network topology analysis and exploration of functional domains represented by the network, indicated that the tumors were of the similar profile. It means that the tumors in both breasts had the same origin, suggesting metastasis. However, the proteome profiles showed that the tumors were not of the aggressive type, and therefore unlikely that the disease would relapse. Immunohistochemistry tests did not provide conclusive basis for selection of chemotherapy or adjuvant therapies. Therefore, the results of Proteomics FMDx ensured oncologists that the most efficient treatment would be by applying tamoxifen, and restrain from chemo- and other adjuvant therapies. The woman has been regularly monitored for recurrence. Thus, for this patient a combination of the proteomics and systems biology allowed to conclude about prognosis of the disease development, select the most suitable treatment, and preserve quality of life.

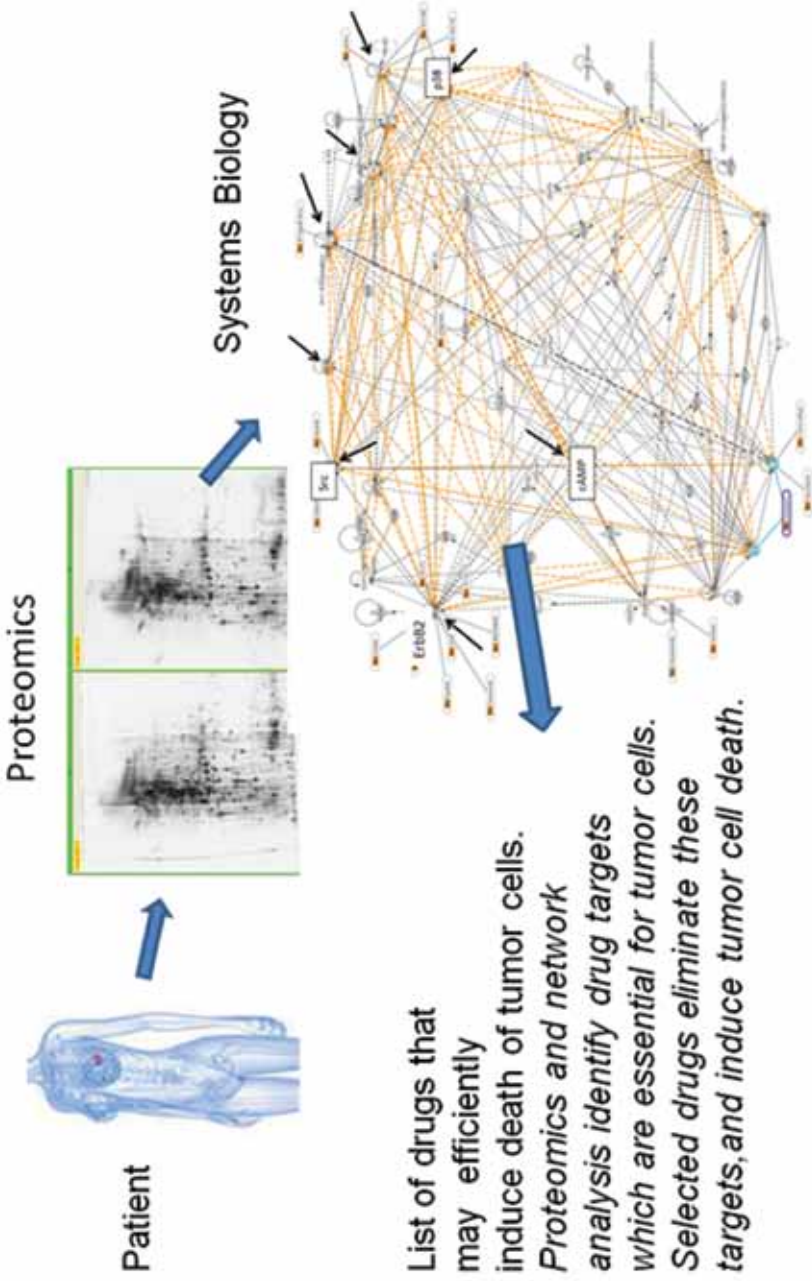


Fig. 5. Workflow of Proteomics FMDx. The tumor sample from the patient is subjected to proteome profiling, which then is analyzed by the systems biology tools. Systemic analysis identifies regulatory mechanisms deregulated in the tumor, and identify drugs which would have a tumor-eliminating effect

Case 2. Personalization of treatment with Organ Culture FMDx

A patient was diagnosed with metastatic pancreatic cancer. Surgery was not applicable, due to multiple metastases. The oncologist required information about efficiency of drugs which were considered for treating this patient.

Biopsies of the primary tumor and metastases were collected. Organ culture samples were prepared immediately after resection of the tumors. Organ culture samples were prepared by using FMDx proprietary technique, and were exposed to drugs. The oncologist was interested in response to 5-fluorouracyl, oxaliplatin and gemcitabine. Two additional drugs were also tested. The first is an inhibitor of EGF receptor kinase, Iressa, and the second drug is an inhibitor of TGF β type I receptor kinase, SB431542. During incubation of the tumor tissues with the drugs, it was observed very strong effect of 5-fluorouracil, significant but partial response to oxaliplatin and gemcitabine. Iressa and SB431542 both showed cell-killing effect, but the response was partial (Fig. 6A). In parallel, Functional Biochemical Assays were applied to the tumor samples. These tests showed significantly enhanced activity of pro-mitogenic kinase Erk1/2 as compared to the Erk1/2 activity in the control carcinoma cells (Fig. 6B). Other biochemical tests showed that EGF and TGF β signaling pathways were active, but at the levels comparable to the control carcinoma cells. The biochemical tests indicate that inhibitors of Erk1/2 pathway, e.g. MEK1 or Raf inhibitors, may have a strong inhibitory impact on the tumor growth for this patient. The tests confirmed also that Iressa and SB431542 indeed may have tumor-suppressing effect. Thus, the Organ Culture FMDx and biochemical tests provided the oncologist with information about efficacy of the tested drug, and indicated that the combination of chemotherapy with adjuvant therapy may be beneficial for the patient.

Organ Culture FMDx delivers informative results during the first 2 weeks of culturing. Longer culturing leads to changes in structure of the tumor tissue, and changes in physiology of tumor cells. These changes affect pattern of the cell response to the drugs. However, longer culturing allows obtaining primary culture of tumor cells which detach from the tumor tissue. These primary culture cells may be further used for research purposes. For this patient, a culture of primary cells was obtained. Thus, Organ Culture FMDx delivered information about sensitivity of the tumors of the patient to the selected drugs.

Case 3. Generation of individualized cancer vaccine

There is a strong confidence among oncologists that as long as the vital functions of a body are not compromised, there is a chance of curing

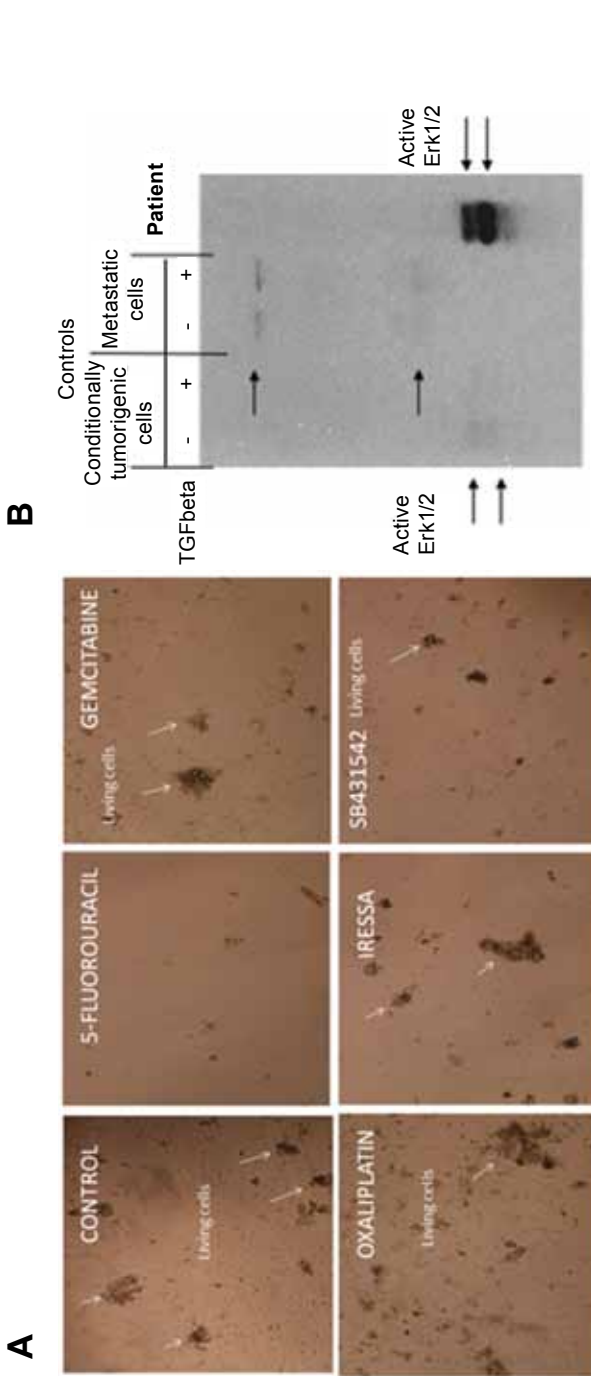


Fig. 6. Organ Culture FMDx. Organ Cultures are prepared from the tumor biopsy. A) Images of the organ culture cultured in a medium only (Control), or incubated with drugs as indicated. Arrows show clusters of living cells. Organ cultures were incubated with the drugs for 48 h. Note presence of living cells in cultures incubated with gemcitabine, oxaliplatin, Iressa and SB431542. B) Functional Biochemical Assay with the same tumor sample, as compared to conditionally tumorigenic and the metastatic control samples. Note that the Erk1/2 signal in the tumor corresponds to the Erk1/2 characteristic in the non-aggressive tumor cells. This assay indicates that the drugs inhibiting Erk1/2 may be beneficial for this patient

even advanced cancer. One of the curation strategies is deciphering of the molecular profile of the tumor, and finding combination of drugs which may kill this tumor. These strategies are mentioned in descriptions of the cases #1 and #2. The case #3 describes the strategy to employ immunological protective mechanisms of the patient's body.

The idea of the individualized cancer vaccine is based on the fact that the body is capable to recognize the tumor epitopes, but the response is too weak to remove the tumor. Therefore, boosting of the anti-tumor immunity is required. Currently, the first type of the anti-tumor vaccines is based on identification of tumor-recognizing lymphocytes, which are then expanded *in vitro*, and injected in the patient. The second type of vaccines is based on identification of tumor antigens which stimulated immunological response, even though weak and not sufficient to eliminate the tumor. These antigens are then purified, and used to boost the anti-tumor immune response.

The presented here case is an example of how such an antigen-based vaccine could be developed (Fig. 7). The patient described in this case could not be subjected to biopsy, due to the weak general condition and numerous metastases. Therefore, a blood sample was taken, and plasma was prepared. The plasma was used to detect tumor-specific antigens. The antigen array was prepared by 2D-GE, and transferring of separated proteins from the gels on the membranes. The transferred tumor proteins were probed with the patient's plasma, and with plasma of healthy individuals. To discriminate tumor and non-tumor antigens further, protein arrays from the non-tumor samples were prepared, and probed with plasma from the patient and from healthy individuals. All these tests allowed identification of 2 strong tumor-specific antigens (Fig. 7A). These antigens were then tested as a scratch-test on the patient. As expected, the antigens showed immunological reactions, with one of the antigens showing reaction justifying use of this antigen for development of the individualized vaccine (Fig. 7B). This selected antigen was prepared in quantities required for vaccination. The antigens were purified, and were subjected to tests of chemical purity, toxicity and sterility. The last test before application of such a vaccine is the scratch-test of responsiveness on the patient. The result was considered positive when there was observed a swelling and redness response after 2 days. Thus, application of proteomics allows generation of truly individual cancer vaccine.

Prospective

Complexity of cancer requires comprehensive evaluation of tumors and patients. Therefore, OMICs technologies have come to stay. We may expect significant improvements in quality of results delivered by profiling

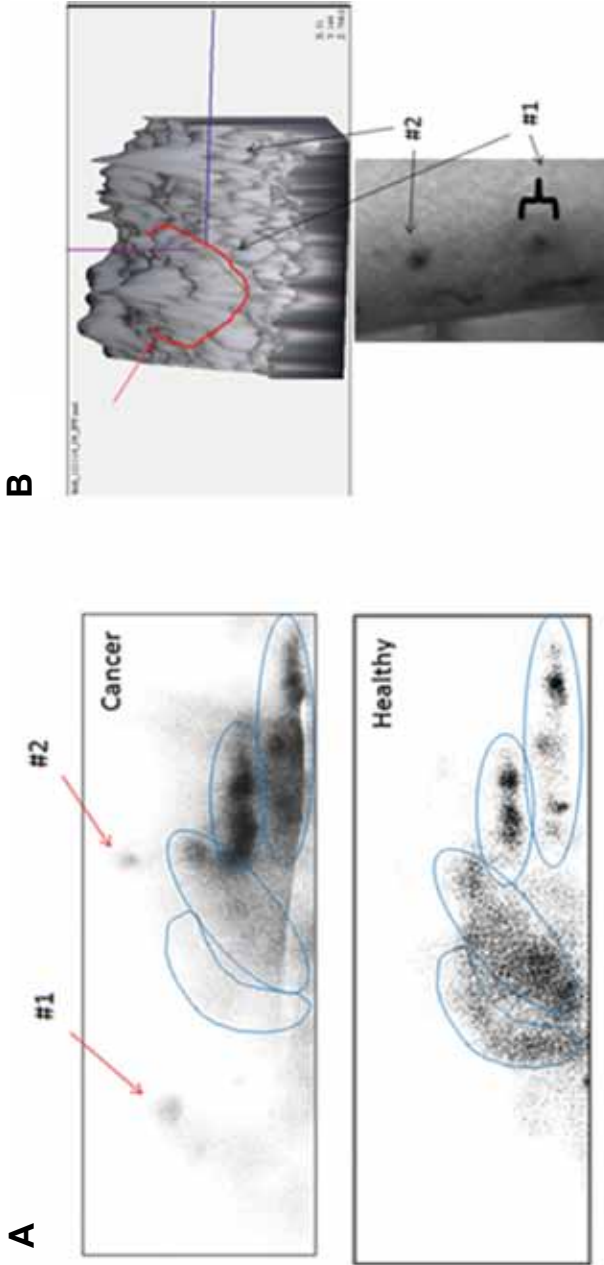


Fig. 7. Development of individualized vaccine as part of FMDx. A) Proteomics is an important part in identification of tumor-specific antigens. Upper panel shows proteins separated in a 2D gel, and recognized by the antibodies of the patient. Lower panel shows the same proteins immunoblotted with antibodies from a healthy individual. #1 and #2 indicate proteins recognized as immunogenic tumor-related antigens. **B)** Identified immunogenic tumor-related antigens were purified, and prepared as a vaccine. The scratch test with the vaccine is shown. The scratch test is performed before applying the vaccine, as part of controls. Note that the antigen #1 produced immunological response. The area of the skin is shown in the lower part of the image, and the computer-assisted analysis of the swelling is indicated in the upper part as the area marked by the red line

of genome, transcriptome, proteome and metabolome of a cancer patient and her/his tumors. Cost efficiency of OMICs technologies will allow performing such profiling on every patient. As an example, FMDx is already affordable for routine use in the cancer clinics.

Developments of OMICs technologies are promoted by the combination of biochemistry, cell and molecular biology, engineering, physics, chemistry and mathematics. When in 1961 Yuriy Gagarin opened the era of manned space flights that was the result of collaboration between many different professionals. The same is valid for cancer – to make a breakthrough and find cure of cancer, a single discovery is not enough. It has to be a combined effort. And the biggest challenge is to create such an organization which would focus on fighting cancer with understanding complexity of this disease and hosting diverse expertise.

Acknowledgments

Support to the works in the authors laboratory from the Swedish Cancer Foundation (CF), the Swedish Research Council (VR), Radiumhemets Research Funds, EurocanPlatform, COMPAS, Swedish Institute and Erasmus program at KI and UWM are acknowledged.

References

1. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell*. – 2011. – **144**(5). – P. 646–674.
2. *Nature* Milestones in Cancer; Ed: Alison Farrell, Ezzie Hutchinson, Barbara Marte and Nicola McCarthy // *Nat. Rev. Cancer*. – 2006. – **6**. – P. S7–S23.
3. Vogelstein B., Kinzler K. W. Cancer genes and the pathways they control // *Nat. Med*. – 2004. – **10**. – P. 789–799.
4. Waliszewski P. Complexity, dynamic cellular network, and tumorigenesis // *Pol. J. Pathol*. – 1997. – **48**(4). – P. 235–241.
5. Casado-Vela J., Cebrián A., Gyme del Pulgar M. T., Lacal J. C. Approaches for the study of cancer: towards the integration of genomics, proteomics and metabolomics // *Clin. Transl. Oncol*. – 2011. – **13**(9). – P. 617–628.
6. Garay J. P., Gray J. W. Omics and therapy - a basis for precision medicine // *Mol. Oncol*. – 2012. – **6**(2). – P. 128–139.
7. Benjamin D. I., Cravatt B. F., Nomura D. K. Global profiling strategies for mapping dysregulated metabolic pathways in cancer // *Cell Metab*. – 2012. – **16**(5). – P. 565–577.
8. Grant G. M., Fortney A., Gorreta F. et al. Microarrays in cancer research // *Anticancer Res*. – 2004. – **24**(2A). – P. 441–448.
9. Gullapalli R. R., Lyons-Weiler M., Petrosko P. et al. Clinical integration of next-generation sequencing technology // *Clin. Lab. Med*. – 2012. – **32**(4). – P. 585–599.
10. Tangrea M. A., Wallis B. S., Gillespie J. W. et al. Novel proteomic approaches for tissue analysis // *Expert. Rev. Proteomics*. – 2004. – **1**(2). – P. 185–192.

11. *Hanash S.* Disease proteomics // *Nature*. – 2003. – **422**(6928). – P. 226–232.
12. *Souchelnytskyi N., Souchelnytskyi S.* Three-dimensional Hp/pI/Mr separation of more than 20,000 intact cellular proteins // *Nat. Methods*. – 2013. – under revision.
13. *Maxam A. M., Gilbert W.* A new method for sequencing DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1977. – **74**(2). – P. 560–564.
14. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1977. – **74**(12). – P. 5463–5467.
15. *Slatko B. E., Kieleczawa J., Ju J. et al.* “First generation” automated DNA sequencing technology // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* – 2011. – Chapter 7:Unit7.2.
16. *Metzker M. L.* Sequencing technologies - the next generation // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – **11**(1). – P. 31–46.
17. *Voelkerding K. V., Dames S., Durtschi J. D.* Diagnostic Next Generation Sequencing // *J. Mol. Diagn.* – 2010. – **12**(5). – P. 539–551.
18. *Meldrum C., Doyle M. A., Tothill R. W.* Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective // *Clin. Biochem. Rev.* – 2011. – **32**(4). – P. 177–195.
19. *Cancer Genome Atlas Network.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours // *Nature*. – 2012. – **490**(7418). – P. 61–70.
20. *Shinawi M., Cheung S. W.* The array CGH and its clinical applications // *Drug Discov. Today*. 2008. – **13**(17–18). – P. 760–770.
21. *Tsuchiya K. D.* Fluorescence in situ hybridization // *Clin. Lab. Med.* – 2011. – **31**(4). – P. 525–542.
22. *Jain K. K.* Current status of fluorescent in-situ hybridisation // *Med. Device Technol.* – 2004. – **15**(4). – P. 14–17.
23. *Ren H., Francis W., Boys A. et al.* BAC-based PCR fragment microarray: high-resolution detection of chromosomal deletion and duplication breakpoints // *Hum. Mutat.* – 2005. – **25**(5). – P. 476–82.
24. *Zecchini V., Mills I. G.* Putting chromatin immunoprecipitation into context // *J. Cell Biochem.* – 2009. – **107**(1). – P. 19–29.
25. *Saxena A., Carninci P.* Whole transcriptome analysis: what are we still missing? // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* – 2011. – **3**(5). – P. 527–543.
26. *Samuel N., Hudson T. J.* Translating genomics to the clinic: implications of cancer heterogeneity // *Clin. Chem.* – 2013. – **59**(1). – P. 127–137.
27. *Hawkins R. D., Hon G. C., Ren B.* Next-generation genomics: an integrative approach // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – **11**(7). – P. 476–486.
28. *Gullapalli R. R., Lyons-Weiler M., Petrosko P. et al.* Clinical integration of next-generation sequencing technology // *Clin. Lab. Med.* – 2012. – **32**(4). – P. 585–599.
29. *Desmedt C., Voet T., Sotiriou C., Campbell P. J.* Next-generation sequencing in breast cancer: first take home messages // *Curr. Opin. Oncol.* – 2012. – **24**(6). – P. 597–604.
30. *Sandoval J., Esteller M.* Cancer epigenomics: beyond genomics // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2012. – **22**(1). – P. 50–55.

31. *Huber-Keener K. J., Liu X., Wang Z. et al.* Differential gene expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells revealed by a new analytical model of RNA-Seq data // *PLoS One.* – 2012. – **7**(7). – P. e41333.
32. *Humphery-Smith I., Cordwell S. J., Blackstock W. P.* Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds // *Electrophoresis.* – 1997. – **18**(8). – P. 1217–1242.
33. *Jiang Z., Zhou Y., Devarajan K. et al.* Identifying putative breast cancer-associated long intergenic non-coding RNA loci by high density SNP array analysis // *Front Genet.* – 2012. – **3.** – P. 299.
34. *Giovannetti E., van der Velde A., Funel N. et al.* High-throughput microRNA (miRNAs) arrays unravel the prognostic role of MiR-211 in pancreatic cancer // *PLoS One.* – 2012. – **7**(11). – P. e49145.
35. *Yan-Fang T., Dong W., Li P. et al.* Analyzing the gene expression profile of pediatric acute myeloid leukemia with real-time PCR arrays // *Cancer Cell Int.* – 2012. – **12**(1). – P. 40.
36. *Cheng S., Koch W. H., Wu L.* Co-development of a companion diagnostic for targeted cancer therapy // *Nat. Biotechnol.* – 2012. – **29**(6). – P. 682–688.
37. *Ong F. S., Das K., Wang J. et al.* Personalized medicine and pharmacogenetic biomarkers: progress in molecular oncology testing // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* – 2012. – **12**(6). – P. 593–602.
38. *Curigliano G., Locatelli M., Fumagalli L. et al.* Targeting the subtypes of breast cancer: rethinking investigational drugs // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* – 2012. – **21**(2). – P. 191–204.
39. *McCourt C. M., Boyle D., James J., Salto-Tellez M.* Immunohistochemistry in the era of personalised medicine // *J. Clin. Pathol.* – 2013. – **66**(1). – P. 58–61.
40. *Souchelnytskyi S.* Current status and challenges of personalized treatment of cancer: View inspired by the workshop // *Exp. Oncol.* – 2011. – **33**(3). – P. 166–169.
41. *Aebersold R., Mann M.* Mass spectrometry-based proteomics // *Nature.* – 2003. – **422**(6928). – P. 198–207.
42. *van den Ouweland J. M., Kema I. P.* The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2012. – **883–884.** P. 18–32.
43. *Conrotto P., Souchelnytskyi S.* Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications // *Exp. Oncol.* – 2008. – **30**(3). – P. 171–180.
44. *Görg A., Weiss W., Dunn M. J.* Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics // *Proteomics.* – 2004. – **4**(12). – P. 3665–3685.
45. *Lopez J. L.* Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – **849**(1–2). – P. 190–202.
46. *Stasyk T., Huber L. A.* Zooming in: fractionation strategies in proteomics // *Proteomics.* – 2004. – **4.** – P. 3704–3716.
47. *Islinger M., Eckerskorn C., Völkl A.* Free-flow electrophoresis in the proteomic era: a technique in flux // *Electrophoresis.* – 2010. – **31**(11). – P. 1754–1763.

48. *Righetti P. G., Sebastiano R., Citterio A.* Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis // *Proteomics*. – 2013. – **13**(2). – P. 325–340.
49. *Xie F., Smith R. D., Shen Y.* Advanced proteomic liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. – 2012. – **1261**. – P. 78–90.
50. *Candy H. S. Lu, Liu K., Tan L. P., Yao S. Q.* Current chemical biology tools for studying protein phosphorylation and dephosphorylation // *Chemistry*. – 2012. – **18**(1). – P. 28–39.
51. *Nodwell M. B., Sieber S. A.* ABPP methodology: introduction and overview // *Top. Curr. Chem.* – 2012. – **324**. – P. 1–41.
52. *Schwamborn K.* Imaging mass spectrometry in biomarker discovery and validation // *J. Proteomics*. – 2012. – **75**(16). – P. 4990–4998.
53. *Van Eeckhaut A., Maes K., Aourz N. et al.* The absolute quantification of endogenous levels of brain neuropeptides *in vivo* using LC-MS/MS // *Bioanalysis*. – 2011. – **3**(11). – P. 1271–1285.
54. *Deutsch E. W., Lam H., Aebersold R.* PeptideAtlas: a resource for target selection for emerging targeted proteomics workflows // *EMBO Rep.* – 2008. – **9**(5). – P. 429–434.
55. *Lee J. R., Magee D. M., Gaster R.S. et al.* Emerging protein array technologies for proteomics // *Expert. Rev. Proteomics*. – 2013. – **10**(1). – P. 65–75.
56. *Sanchez-Carbayo M.* Antibody microarrays as tools for biomarker discovery // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – **785**. – P. 159–182.
57. *Carlsson A., Wingren C., Ingvarsson J. et al.* Serum proteome profiling of metastatic breast cancer using recombinant antibody microarrays // *Eur. J. Cancer*. – 2008. – **44**(3). – P. 472–480.
58. *Bowen B. P., Northen T. R.* Dealing with the unknown: metabolomics and metabolite atlases // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* – 2010. – **21**(9). – P. 1471–1476.
59. *O'Connell T. M.* Recent advances in metabolomics in oncology // *Bioanalysis*. – 2012. – **4**(4). – P. 431–451.
60. *Zhou W., Liotta L. A., Petricoin E. F.* Cancer metabolism: what we can learn from proteomic analysis by mass spectrometry // *Cancer Genomics Proteomics*. – 2012. – **9**(6). – P. 373–381.

THE VITAL IMPORTANCE OF PROVIDING SOUND SCIENTIFIC ADVICE TO POLICY MAKERS IN GOVERNMENT

Graham S. PEARSON†

*Visiting Professor of International Security
Division of Peace Studies
University of Bradford;
Bradford, West Yorkshire BD7 1DP, United Kingdom*

1. The Biological and Toxin Weapons Convention (BTWC) was opened for signature on 10 April 1972 and entered into force on 26 March 1975. The Co-Depositaries for this Convention are the Russian Federation, the United Kingdom and the United States. This Convention was the first one to totally prohibit the development, production and stockpiling of a class of weapons of mass destruction – that involving the use of biological agents and toxins as weapons. The Ukraine was one of the original States Parties who signed the Convention on 10 April 1972 and for whom the Convention entered into force on 26 March 1975. The central prohibition is set out in Article I of the Convention [1] under which:

Each State Party to this Convention undertakes never in any circumstances to develop, produce, stockpile or otherwise acquire or retain:

(1) Microbial or other biological agents, or toxins whatever their origin or method of production, of types and quantities that have no justification for prophylactic, protective or other peaceful purposes;

(2) Weapons, equipment or means of delivery designed to use such agents or toxins for hostile purposes or in armed conflict.

2. In accordance with Article XII of the Convention, Review Conferences have been held at five year intervals – in 1981, 1986, 1991, 1996, 2001/2, 2006 and 2011 – *to review the operation of the Convention, with a view to ensuring that the purposes of the preamble of the Convention, ... are being realized.* In addition, it is required that *Such review shall take into account any new scientific and technological developments relevant to the Convention.* It is thus evident that the continuing and effective implementation of the Convention requires that the States Parties carrying out the five yearly Review Conferences need to be advised of any relevant new scientific and technological developments and of what their significance

† Previously the Director-General of the Chemical and Biological Defence Establishment, Porton Down, UK from 1984 to 1995.

is for the Convention and what should be done in order to ensure that the effectiveness of the Convention is maintained.

3. The need to be able to provide sound scientific advice to policy makers and diplomats in government in each State Party is thus enshrined in the BTWC. And, it is also evident that the delegations sent by States Parties to the Review Conferences will need to include qualified and knowledgeable scientists who will be able to provide advice to the delegations during the Review Conferences on approaches to be adopted by the delegation as well as how to respond to scientific and technical information submitted and recommendations made by other delegations.

4. Although Review Conferences take place at five year intervals, the practice has been adopted since the decision of the Fifth Review Conference in 2002, to have an intersessional programme during which the States Parties are each year *to discuss and promote common understandings and effective action* on specified topics first at an annual Meeting of Experts and then subsequently at an annual Meeting of States Parties. As might be expected, the delegations sent to the Meeting of Experts need to include qualified and knowledgeable scientists who will be able to provide advice to the delegations during the Meeting of Experts at which scientific and technical details are discussed and debated in regard to the specific items so as to ensure that the ideas captured in the Annex to the Meeting of Experts are correctly expressed and can lead to being agreed in the substantive paragraphs of the subsequent Meeting of States Parties later that year that will be considering the same specific topics.

QUALIFIED AND KNOWLEDGEABLE SCIENTISTS

5. For scientists to be effective in providing advice to the policy makers and the diplomats, there are several essential characteristics that the scientist is required to have.

Awareness and understanding of the BTWC

6. An essential prerequisite for any scientist providing advice to policy makers and diplomats on the BTWC is an understanding of the Convention and an appreciation of what the various Articles of the Convention oblige States Parties to do. In addition, the scientist needs to be aware of the extended understandings that have been agreed by the States Parties at the successive Review Conferences. This overall awareness and understanding is essential if the advice is going to be credible and helpful to the policy makers and diplomats.

7. In addition, the advice will be much more effective if the scientist is also aware of what the last Review Conference has decided – the Final

Report of the Review Conference and, in particular, its *Final Declaration* and its *Decisions and Recommendations* set the scene for the current Intersessional Period and have decided the specific topics to be discussed in order to *promote common understandings and effective action*.

Ability to analyse, summarise and express relevant scientific aspects

8. Another essential prerequisite is that the scientist providing scientific advice is able to analyse and summarise the relevant scientific aspects of the particular topic on which advice is to be given to the policy makers and diplomats. Such analysis has to be able to identify the key elements that are relevant and these need to be expressed so that the implications in regard to the various elements of the Convention are clearly appreciated and understood by the policy makers and diplomats. In other words, the relevant scientific aspects have to be analysed, summarized and presented in the **context** of the Convention together with proposals as to what steps should be taken by the policy makers and diplomats. Throughout, the scientist has to be answering the question that the policy makers and diplomats will be asking themselves about the scientific aspects – “So what?” In other words, what do the scientific aspects mean in the context of the Convention.

Awareness of the risks to humans, animals and plants

9. One of the extended understandings that the States Parties have agreed at the successive Review Conferences is encapsulated in the language relating to Article I of the Convention in the Final Declaration [2] of the Seventh Review Conference that states:

*1. The Conference reaffirms the importance of Article I, as it defines the scope of the Convention. The Conference declares that the Convention is comprehensive in its scope and that all naturally or artificially created or altered microbial and other biological agents and toxins, as well as their components, regardless of their origin and method of production and whether they affect **humans, animals or plants**, of types and in quantities that have no justification for prophylactic, protective or other peaceful purposes, are unequivocally covered by Article I. [Emphasis added]*

This makes it clear that the prohibition in the Convention applies to *microbial and other biological agents and toxins* that affect *humans, animals or plants*. It consequently follows that the scientists providing policy advice on the BTWC to the policy makers and diplomats need to be aware of the activities being carried out by the World Health Organization (WHO) [3], the World Animal Health Organization (OIE) [4] and the Food and Agriculture Organization (FAO) [5] in regard to countering outbreaks of

human, animal and plant diseases and to promote human health security, animal health security and food security.

10. These scientists providing policy advice need also to be aware that the terminology used in regard to terms such as biosafety, biosecurity and food security can be different in the WHO, OIE and FAO arenas than that used in the context of the Convention.

Awareness of the risks to the environment

11. As the prohibition in the Convention relates to *microbial and other biological agents and toxins* that affect *humans, animals or plants*, it will be appreciated that there is a close relationship to the environment. Consequently, the scientists providing advice need also to be aware of the Conventions and Protocols that relate to the environment – and in particular to the Convention on Biological Diversity and its associated Cartagena Protocol on Biosafety.

The Convention on Biological Diversity (CBD) [6] was the result of an increasing global awareness that:

The Earth's biological resources are vital to humanity's economic and social development. As a result, there is a growing recognition that biological diversity is a global asset of tremendous value to present and future generations. At the same time, the threat to species and ecosystems has never been so great as it is today. Species extinction caused by human activities continues at an alarming rate.

The CBD was opened for signature on 5 June 1992 at the United Nations Conference on Environment and Development (the Rio “Earth Summit”) and entered into force on 29 December 1993. It has currently 193 Parties to the Convention.

12. A particular element of the CBD arises from Article 18 Technical and Scientific Cooperation which requires that:

1. The Contracting Parties shall promote international technical and scientific cooperation in the field of conservation and sustainable use of biological diversity, where necessary, through the appropriate international and national institutions.

2. Each Contracting Party shall promote technical and scientific cooperation with other Contracting Parties, in particular developing countries, in implementing this Convention, inter alia, through the development and implementation of national policies. In promoting such cooperation, special attention should be given to the development and strengthening of national capabilities, by means of human resources development and institution building.

3. The Conference of the Parties, at its first meeting, shall determine how to establish a clearing-house mechanism to promote and facilitate technical and scientific cooperation.

The clearing-house mechanism addressed in paragraph 3 of Article 18 has as its mission the requirement to contribute significantly to the implementation of the Convention on Biological Diversity through effective information services and other appropriate means in order to promote and facilitate scientific and technical cooperation, knowledge sharing and information exchange, and to establish a fully operational network of Parties and partners.

13. Closely associated with the CBD is its Cartagena Protocol on Biosafety [7]. This addresses the movements of living modified organisms (LMOs) resulting from modern biotechnology from one country to another. It was adopted on 29 January 2000 as a supplementary agreement to the Convention on Biological Diversity and entered into force on 11 September 2003. It establishes an advance informed agreement (AIA) procedure for ensuring that countries are provided with the information necessary to make informed decisions before agreeing to the import of such organisms into their territory. The Protocol contains reference to a precautionary approach. The Protocol also establishes a Biosafety Clearing-House to facilitate the exchange of information on living modified organisms and to assist countries in the implementation of the Protocol. It has currently 166 Parties to the Protocol. The Ukraine Profile is available at <http://bch.cbd.int/about/countryprofile.shtml?country=ua>.

14. Article 22 of the Protocol addresses *Capacity Building* and requires that:

1. The Parties shall cooperate in the development and/or strengthening of human resources and institutional capacities in biosafety, including biotechnology to the extent that it is required for biosafety, for the purpose of the effective implementation of this Protocol, in developing country Parties, in particular the least developed and small island developing States among them, and in Parties with economies in transition, including through existing global, regional, subregional and national institutions and organizations and, as appropriate, through facilitating private sector involvement.

2. For the purposes of implementing paragraph 1 above, in relation to cooperation, the needs of developing country Parties, in particular the least developed and small island developing States among them, for financial resources and access to and transfer of technology and know-how in accordance with the relevant provisions of the Convention, shall be

taken fully into account for capacity-building in biosafety. Cooperation in capacity-building shall, subject to the different situation, capabilities and requirements of each Party, include scientific and technical training in the proper and safe management of biotechnology, and in the use of risk assessment and risk management for biosafety, and the enhancement of technological and institutional capacities in biosafety. The needs of Parties with economies in transition shall also be taken fully into account for such capacity-building in biosafety.

15. Closely related to the biosafety requirements for the Protocol is the initiative taken by the United Nations Environment Programme to implement the *Global Environment Facility (GEF) Initial Strategy on Biosafety* [8] which was adopted in November 2000. This Strategy aims to assist countries preparing for the Cartagena Biosafety Protocol through the establishment of National Biosafety Frameworks (NBFs). The NBF is a combination of policy, legal, administrative and technical instruments that are set in place to address safety for the environment and human health in relation to modern biotechnology. As at 30th May 2012, 119 countries have completed the majority of development of their National Biosafety Projects and their draft NBFs are available online [9]. This includes the draft National Biosafety Framework for the Ukraine. These projects have generated a wealth of in-country experience in building capacity for biosafety.

16. These National Biosafety Frameworks are highly relevant to the initiatives being taken to strengthen biosafety and biosecurity under the BTWC and scientific experts advising national diplomats and policy makers need to be aware of their relevance.

17. There are also, as might be expected, relevant activities in regard to education and awareness. Thus the Convention on Biological Diversity in its Article 13 *Public Education and Awareness* requires that:

The Contracting Parties shall:

(a) Promote and encourage understanding of the importance of, and the measures required for, the conservation of biological diversity, as well as its propagation through media, and the inclusion of these topics in educational programmes; and

(b) Cooperate, as appropriate, with other States and international organizations in developing educational and public awareness programmes, with respect to conservation and sustainable use of biological diversity.

Likewise the Cartagena Protocol on Biosafety in its Article 23 *Public Awareness and Education* requires that:

1. *The Parties shall:*

(a) *Promote and facilitate public awareness, education and participation concerning the safe transfer, handling and use of living modified organisms in relation to the conservation and sustainable use of biological diversity, taking also into account risks to human health. In doing so, the Parties shall cooperate, as appropriate, with other States and international bodies;*

(b) *Endeavour to ensure that public awareness and education encompass access to information on living modified organisms identified in accordance with this Protocol that may be imported.*

There are consequently clear benefits to States Parties to the BTWC if those scientists providing advice to diplomats and policy makers are aware of the international and national activities associated with the Convention on Biological Diversity and its Cartagena Protocol on Biosafety.

Awareness of CBRN risks and preparedness

18. Whilst it may be thought that scientists providing advice to diplomats and policy makers need only be aware of the life sciences, their advice will be much more effective if they are also aware of the broader chemical, biological, radiological and nuclear risks as to an increasing extent countries are coordinating their preparedness for CBRN incidents whether accidental or deliberate.

19. **The Chemical Weapons Convention.** The CWC [10] is closely related to the BTWC and it prohibits the development, production and stockpiling of chemical weapons. In Article I *General Obligations* it requires that:

1. *Each State Party to this Convention undertakes never under any circumstances:*

(a) *To develop, produce, otherwise acquire, stockpile or retain chemical weapons, or transfer, directly or indirectly, chemical weapons to anyone;*

(b) *To use chemical weapons;*

(c) *To engage in any military preparations to use chemical weapons;*

(d) *To assist, encourage or induce, in any way, anyone to engage in any activity prohibited to a State Party under this Convention.*

and in its Article II Definitions and Criteria states that:

For the purposes of this Convention:

1. *“Chemical Weapons” means the following, together or separately:*

- (a) *Toxic chemicals and their precursors, except where intended for purposes not prohibited under this Convention, as long as the types and quantities are consistent with such purposes;*
- (b) *Munitions and devices, specifically designed to cause death or other harm through the toxic properties of those toxic chemicals specified in subparagraph (a), which would be released as a result of the employment of such munitions and devices;*
- (c) *Any equipment specifically designed for use directly in connection with the employment of munitions and devices specified in subparagraph (b).*

2. “Toxic Chemical” means:

Any chemical which through its chemical action on life processes can cause death, temporary incapacitation or permanent harm to humans or animals. This includes all such chemicals, regardless of their origin or of their method of production, and regardless of whether they are produced in facilities, in munitions or elsewhere.

As the BTWC addresses *Microbial or other biological agents, or toxins whatever their origin or method of production* it is evident that there is – and rightly so – an overlap between the two Conventions with chemicals such as toxins being prohibited under both Conventions.

20. The Chemical Weapons Convention opened for signature on 13 January 1993 and entered into force on 29 April 1997. It currently has 188 States Parties. The CWC has concentrated in its first fifteen years on the destruction of declared chemical weapons stockpiles – the Convention in Article IV requires that *Each State Party shall destroy all chemical weapons ... Such destruction ... shall finish no later than 10 years after entry into force of the Convention*. In addition, Part IV(A) of the Verification Annex to the Convention includes provisions should a State Party believe that *it will be unable to ensure the destruction of all Category 1 chemical weapons not later than 10 years after the entry into force of this Convention* then the Executive Council can grant an extension – however, it is specified that *Any extension shall be the minimum necessary, but in no case shall the deadline for a State Party to complete its destruction of all chemical weapons be extended beyond 15 years after the entry into force of this Convention*. The Convention is now focusing much more on the non-proliferation and other requirements required by the Convention and the activities of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons are more closely related to those being carried out by the States Parties to the BTWC.

21. **The 1925 Geneva Protocol.** This is the *Protocol for the Prohibition of the Use in War of Asphyxiating, Poisonous or other Gases, and of Bacte-*

riological Methods of Warfare [11] which was signed at Geneva on 17 June 1925. This notes that:

Whereas the use in war of asphyxiating, poisonous or other gases, and of all analogous liquids, materials or devices, has been justly condemned by the general opinion of the civilised world; and

Whereas the prohibition of such use has been declared in Treaties to which the majority of Powers of the world are Parties; and

To the end that this prohibition shall be universally accepted as a part of International Law, binding alike the conscience and the practice of nations;

and goes on to declare that:

Declare:

That the High Contracting Parties, so far as they are not already Parties to Treaties prohibiting such use, accept this prohibition, agree to extend this prohibition to the use of bacteriological methods of warfare and agree to be bound as between themselves according to the terms of this declaration.

The High Contracting Parties will exert every effort to induce other States to accede to the present Protocol. Such accession will be notified to the Government of the French Republic, and by the latter to all signatory and acceding Powers, and will take effect on the date of the notification by the Government of the French Republic.

22. It should be noted that at the Seventh Review Conference of the BTWC, the States Parties agreed in their Final Declaration [12] in regard to Article VIII of the BTWC that:

41. The Conference appeals to all States Parties to the 1925 Geneva Protocol to fulfil their obligations assumed under that Protocol and urges all states not yet party to the Protocol to ratify or accede to it without further delay.

42. The Conference acknowledges that the 1925 Geneva Protocol, which prohibits the use in war of asphyxiating, poisonous or other gases, and of bacteriological methods of warfare, and the Convention complement each other. The Conference reaffirms that nothing contained in the Convention shall be interpreted as in any way limiting or detracting from the obligations assumed by any state under the 1925 Geneva Protocol.

43. The Conference stresses the importance of the withdrawal of all reservations to the 1925 Geneva Protocol related to the Convention.

44. *The Conference recalls the actions which States Parties have taken to withdraw their reservations to the 1925 Geneva Protocol related to the Convention, and calls upon those States Parties that continue to maintain pertinent reservations to the 1925 Geneva Protocol to withdraw those reservations, and to notify the Depository of the 1925 Geneva Protocol accordingly, without delay.*

45. *The Conference notes that reservations concerning retaliation, through the use of any of the objects prohibited by the Convention, even conditional, are totally incompatible with the absolute and universal prohibition of the development, production, stockpiling, acquisition and retention of bacteriological (biological) and toxin weapons, with the aim to exclude completely and forever the possibility of their use.*

46. *The Conference notes that the Secretary-General's investigation mechanism, set out in A/44/561 and endorsed by the General Assembly in its resolution 45/57, represents an international institutional mechanism for investigating cases of alleged use of biological or toxin weapons. The Conference notes national initiatives to provide relevant training to experts that could support the Secretary-General's investigative mechanism.*

23. Universal adherence to the Geneva Protocol by all States, including all States Parties to the BTWC, has been an agreed politically binding commitment since 1980, reaffirmed by every subsequent Review Conference that has issued a *Final Declaration*. It should be noted that the original statement, in the *Final Declaration* which the First Review Conference agreed on 21 March 1980, called on all States not yet parties to the Geneva Protocol to ratify or accede to it at the earliest possible date; the Second Review Conference on 26 September 1986 urged them to adhere to it at the earliest possible date; the Third Review Conference on 27 September 1991 urged them to accede to it without delay, as did the Fourth Review Conference on 6 December 1996, the Sixth Review Conference on 8 December 2006 and the Seventh Review Conference on 22 December 2011.

24. **Secretary-General Mechanism for Investigation of Alleged Use [13].** Article VI of the BTWC states that:

(1) Any State Party to this Convention which finds that any other State Party is acting in breach of obligations deriving from the provisions of the Convention may lodge a complaint with the Security Council of the United Nations. Such a complaint should include all possible evidence confirming its validity, as well as a request for its consideration by the Security Council.

(2) Each State Party to this Convention undertakes to cooperate in carrying out any investigation which the Security Council may initiate, in

accordance with the provisions of the Charter of the United Nations, on the basis of the complaint received by the Council. The Security Council shall inform the States Parties to the Convention of the results of the investigation.

25. At the Seventh Review Conference, the States Parties to the BTWC agreed in their Final Declaration [14] in regard to Article VI that:

29. The Conference invites the Security Council:

(a) to consider immediately any complaint lodged under this Article and to initiate any measures it considers necessary for the investigation of the complaint in accordance with the Charter;

(b) to request, if it deems necessary and in accordance with its Resolution 620 of 1988, the United Nations Secretary-General to investigate the allegation of use, using the technical guidelines and procedures contained in Annex I of United Nations Document A/44/561;

(c) to inform each State Party of the results of any investigation initiated under this Article and to consider promptly any appropriate further action which may be necessary.

26. The Secretary-General's Mechanism (SGM) for the investigation of alleged use of chemical, biological and toxin weapons derives from a mandate established by the United Nations General Assembly in its resolution 42/37C of 1987 and reaffirmed by the United Nations Security Council through its resolution 620 (1988). Under this mandate, the Secretary-General is requested

to carry out investigations in response to reports that may be brought to his attention by any Member State concerning the possible use of chemical and bacteriological (biological) or toxin weapons that may constitute a violation of the Geneva Protocol or other relevant rules of customary international law in order to ascertain the facts of the matter and to report promptly the results of any such investigations to all Member States.

Investigations of alleged use will be conducted according to technical guidelines and procedures (A/44/561 Annex I) which were endorsed by the General Assembly in 1990. The appendices to the technical guidelines and procedures were updated in 2007.

27. **Security Council Resolution 1540(2004)** [15]. In 2004, the Security Council decided that all States shall refrain from providing any form of support to non-State actors who attempt to develop, acquire, manufacture, possess, transport, transfer or use nuclear, chemical or biological weapons and their means of delivery, and requires all States to adopt and enforce

appropriate effective laws to this effect. The resolution also requires all States to establish various types of domestic controls to prevent the proliferation of such weapons and their related materials. A Security Council Committee was established pursuant to resolution 1540 to report to the Council on the implementation of the resolution. Security Council resolution 1977 (2011) extended the mandate of the Committee until 25 April 2021.

28. The 1540 Committee has prepared matrices for 179 of the Member States of the United Nations which following approval by the Committee in November and December 2010 are available at <http://www.un.org/sc/1540/1540matrix.shtml>. This in *OP 2 - Biological Weapons (BW)* requests States to answer the question:

Does national legislation exist which prohibits persons or entities to engage in one of the following activities? Can violators be penalized?

in regard to some 14 activities:

- 1 *manufacture/produce*
- 2 *acquire*
- 3 *possess*
- 4 *stockpile/store*
- 5 *develop*
- 6 *transport*
- 7 *transfer*
- 8 *use*
- 9 *participate as an accomplice in above-mentioned activities*
- 10 *assist in above-mentioned activities*
- 11 *finance above-mentioned activities*
- 12 *above-mentioned. activities related to means of delivery*
- 13 *involvement of non-State actors in above-mentioned. activities*
- 14 *Other*

29. In addition, the matrix in *OP 3 (a) and (b) - Account for/Secure/Physically protect BW including Related Materials* requests States to answer the question:

Are any of the following measures, procedures or legislation in place to account for, secure or otherwise protect BW and Related Materials? Can violators be penalized?

in regard to some 17 categories;

- 1 *Measures to account for production*
- 2 *Measures to account for use*
- 3 *Measures to account for storage*

- 4 Measures to account for transport*
- 5 Other measures for accounting*
- 6 Measures to secure production*
- 7 Measures to secure use*
- 8 Measures to secure storage*
- 9 Measures to secure transport*
- 10 Other measures for securing*
- 11 Regulations for physical protection of facilities/materials/ transports*
- 12 Licensing/registration of facilities/persons handling biological materials*
- 13 Reliability check of personnel*
- 14 Measures to account for/secure/ physically protect means of delivery*
- 15 Regulations for genetic engineering work*
- 16 Other legislation/ regulations related to safety and security of biological materials*
- 17 Other*

30. The matrix in *OP 3 (c) and (d) and related matters from OP 6 and OP 10 - Controls of BW including Related Materials* requests States to answer the question:

Which of the following legislation, procedures, measures, agencies exist to control border crossings, export/import and other transfers of BW and Related Materials? Can violators be penalized?

in regard to some 26 categories:

- 1 Border control*
- 2 Technical support of border control measures*
- 3 Control of brokering, trading in, negotiating, otherwise assisting in sale of goods and technology*
- 4 Enforcement agencies/authorities*
- 5 Export control legislation in place*
- 6 Licensing provisions*
- 7 Individual licensing*
- 8 General licensing*
- 9 Exceptions from licensing*
- 10 Licensing of deemed export/visa*
- 11 National licensing authority*
- 12 Interagency review for licenses*
- 13 Control lists*
- 14 Updating of lists*
- 15 Inclusion of technologies*
- 16 Inclusion of means of delivery*
- 17 End-user controls*

- 18 *Catch-all clause*
- 19 *Intangible transfers*
- 20 *Transit control*
- 21 *Trans-shipment control*
- 22 *Re-export control*
- 23 *Control of providing funds*
- 24 *Control of providing transport services*
- 25 *Control of importation*
- 26 *Extraterritorial applicability*
- 27 *Other*

These matrices provide a valuable resource that can be drawn upon by the States Parties to the BTWC in promoting the implementation of Article IV of the Convention.

31. The completed matrices for the Ukraine are available at:

http://www.un.org/en/sc/1540/docs/matrices/Ukraine_revised_matrix.pdf

and provide detailed information on the legislation and procedures that apply in the Ukraine in regard to activities relating to biological weapons as well as to chemical and nuclear weapons.

32. **European Union Public Health Preparedness for Cross-Border Health Threats** [16]. On 8 December 2011 the European Commission adopted a legislative proposal on the means to address serious cross-border health threats. This proposal is to extend the existing co-ordination mechanism for communicable diseases to all health threats caused by biological, chemical or environmental causes. It provides for the assessment of risks and the co-ordination of measures from communicable diseases to be extended to all health threats caused by biological, chemical or environmental causes.

33. **United Nations Interregional Crime and Justice Research Institute (UNICRI) CBRN Risk Mitigation and Security Governance Programme** [17]. This was launched in 2004, in conjunction with the IAEA, the OPCW, the ISU of the BTWC, the WHO, INTERPOL and the World Customs Organization (WCO, to support the development of an **integrated CBRN approach** that incorporates all international, regional and national CBRN components into a common strategy. This entails the application of a holistic approach through which all stakeholders, while operating autonomously, can establish common goals, identify and manage resources to achieve these goals, clearly allocate responsibilities and tasks, elaborate functioning channels of communication, create a security culture based

on common learning, and ensure that lessons learnt are incorporated and absorbed throughout the whole system.

34. A closely associated element of this programme is to establish regional **CBRN Centres of Excellence** [18]. Such centres are seen as a cornerstone of these activities by offering a coherent and comprehensive approach covering legal, regulatory, enforcement and technical issues. It is evident that a number of projects will involve the Ukraine including one launched in January 2013 entitled *Knowledge development and transfer of best practice on bio-safety, bio-security, bio-risk management*.

Conclusions

35. This paper has sought to give an indication of the breadth of activities that scientists need to be aware of if they are to be effective in providing advice to the policy makers and the diplomats in Government. It needs to be recognised that the policy makers and diplomats engaged in a particular activity such as the Biological and Toxin Weapons Convention (BTWC) may well not be involved in some of the other relevant activities and thus be unaware of relevant developments in these other activities. The value that qualified and knowledgeable scientists can bring is thus considerable as they are able to analyse the situation across the range of relevant activities and can use their knowledge to make soundly based proposals that will frequently be acceptable to their fellow scientists in other delegations.

36. For the qualified and knowledgeable scientists to be effective it is vital that the scientist providing scientific advice is able to analyse and summarise the relevant scientific aspects of the particular topic on which advice is to be given to the policy makers and diplomats. Such analysis has to be able to identify the key elements that are relevant and these need to be expressed so that the implications in regard to the various elements of the Convention are clearly appreciated and understood by the policy makers and diplomats. In other words, the relevant scientific aspects have to be analysed, summarized and presented in the **context** of the Convention together with proposals as to what steps should be taken by the policy makers and diplomats.

37. These qualified and knowledgeable scientists also have a continuing responsibility once they have successfully explained the context of the relevant scientific aspects to the policy makers and diplomats to then follow through by encouraging the national policy makers to take appropriate action nationally to implement the changes that would enhance the effectiveness nationally of the implementation of the BTWC.

38. Qualified and knowledgeable scientists who are effective in providing advice to the policy makers and diplomats have an additional bonus – in that they are well qualified to assist in raising awareness and facilitating outreach to all those engaged in the life sciences about the issues and the progress being made by the States Parties in strengthening the effectiveness of the Biological and Toxin Weapons Convention and thereby helping to make it a safer world for all of us.

Postscript

39. I have chosen to write this article on *The Vital Importance of Providing Sound Scientific Advice to Policy Makers in Government* in recognition of the outstanding contributions that Ambassador Professor Dr. Serhiy Vasilyovich Komisarenko has made as a member of the delegation of the Ukraine, which he has frequently led, to the meetings of the States Parties to the Biological and Toxin Weapons Convention in Geneva over the past eight years.

References

1. *Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on Their Destruction*, available at <http://www.opbw.org/> and at [http://www.unog.ch/80256EE600585943/\(httpPages\)/04FBBDD6315AC720C1257180004B1B2F?OpenDocument](http://www.unog.ch/80256EE600585943/(httpPages)/04FBBDD6315AC720C1257180004B1B2F?OpenDocument)
2. *United Nations*, The Seventh Review Conference of the States Parties to the Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on their Destruction, Geneva, 5 - 22 December 2011, *Final Document*, BWC/CONF.VII/7, 13 January 2012. Available at <http://unog.ch/bwc> and at <http://www.opbw.org>
3. See http://www.who.int/ihr/biosafety/publications_WHO_CDS_EPR_2006_6/en/
4. See <http://www.oie.int/our-scientific-expertise/biological-threat-reduction/>
5. See <http://www.fao.org/wsfs/en/>
6. See <http://www.cbd.int/convention>
7. See <http://bch.cbd.int/protocol/>
8. See <http://www.unep.org/biosafety/>
9. Available at <http://www.unep.org/biosafety/National%20Biosafety%20frameworks.aspx>
10. See <http://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/>
11. See <http://www.un.org/disarmament/WMD/Bio/1925GenevaProtocol.shtml>

12. *United Nations*, The Seventh Review Conference of the States Parties to the Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on their Destruction, Geneva, 5 - 22 December 2011, *Final Document*, BWC/CONF. VII/7, 13 January 2012. Available at <http://unog.ch/bwc> and at <http://www.opbw.org>
13. See http://www.un.org/disarmament/WMD/Secretary-General_Mechanism/
14. *United Nations*, The Seventh Review Conference of the States Parties to the Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on their Destruction, Geneva, 5 - 22 December 2011, *Final Document*, BWC/CONF. VII/7, 13 January 2012. Available at <http://unog.ch/bwc> and at <http://www.opbw.org>
15. See <http://www.un.org/en/sc/1540/>
16. See http://ec.europa.eu/health/preparedness_response/policy/hsi/index_en.htm
17. See <http://www.unicri.it/topics/cbrn/>
18. See <http://www.unicri.it/topics/cbrn/coe/> and <http://www.cbrn-coe.eu/>

THE CREATION OF A CONTAGIOUS H5N1 INFLUENZA VIRUS: IMPLICATIONS FOR THE EDUCATION OF LIFE SCIENTISTS

*Tatyana NOVOSSIOLOVA, Masamichi MINEHATA,
Malcolm DANDO*

*Bradford Disarmament Research Centre Division of Peace Studies School of Social
and International Studies University of Bradford UK*

The paper contends that the ongoing controversy surrounding the creation of a contagious H5N1 influenza virus has already exposed the severe limitations of the possibility of preventing the hostile misuse of the life sciences by dint of oversight of proposals and publications. It further argues that in order to prevent the potential wholesale militarisation of the life sciences, it is essential that life scientists become aware of their responsibilities within the context of the Biological and Toxin Weapons Convention (BTWC) and actively contribute their expertise to strengthening the biological weapons non-proliferation regime.

“...The race is on for scientists to find out as much as they can about H5N1 and detect any mutations that make it a human-to-human virus as soon as possible. At least then they will know exactly what it is they are fighting.... In many ways, it [influenza virus] is the perfect form of bio-terrorism - simple yet devastating.”

Revell J. (2005) Everything you need to know about Bird Flu and what you can do to prepare for it. (page 27) Rodale, London.

By April 2012 there have been 602 laboratory-confirmed cases of human infection with highly pathogenic avian influenza H5N1 virus [1]. 355 of these people died, but sustained human-to-human transmission had not been demonstrated. Then in late 2011 it was reported that life scientists in The Netherlands and the United States had shown how the H5N1 virus could be made contagious through the air in mammals. This provoked a wide-ranging debate about whether, and how, the work should be published, or, indeed, whether it should have been carried out in the first place.

Whilst that debate has, at the time of writing this paper, not yet finished, it is our contention that it has already exposed the severe limitations of the approach to the responsibilities of life scientists which has dominated discussions of the hostile misuse of the life sciences since 9/11 and the anthrax letter attacks in the United States. This approach, which

is typified by the Fink Report [2] on Biotechnology Research in an Age of Terrorism of 2004, suggests that as terrorists might misuse advanced life science research, such dual-use dangers can be prevented by restrictions (oversight) of project proposals and publications.

This paper begins by examination of the debate provoked by the attempt to publish the papers on contagious H5N1 and argues that there are good reasons why the bioterror/dualuse approach can only be relevant to a small part of the problem of containing the potential hostile misuse of the results of the ongoing revolution in the life sciences. That leads on to our suggestion that the real problem is that biotechnology, like other scientific and technological revolutions in the past, may, as pointed out by Professor Mathew Meselson [3] in 2000, be “intensively exploited, not only for peaceful purposes but also for hostile ones.” In short, bioterrorism and the exploitation of the results of advances in the life sciences by terrorists has to be seen in the wider framework of the potential wholesale militarization of the life sciences, and a much wider set of responsibilities than oversight of projects and publications is required of life scientists if their work is to be properly protected from misuse.

For this reason, the paper then briefly introduces the history of offensive State-level biological weapons programmes during the last century and the gradual development of the prohibition regime centred on the 1975 Biological and Toxin Weapons Convention (BTWC). It is argued that life scientists’ responsibilities have to be seen within this wider framework and the ‘web of preventive policies’ centred on the BTWC, and that the issue of dual-use and bioterrorism is better understood as part of this wider framework.

This then leads on to an examination of the discussions amongst State Parties to the BTWC about awareness-raising and education of life scientists during this century. The paper ends with our own reflections on what needs to be covered in the education of life scientists for them to be able to actively engage in effectively protecting their benignly-intended work from misuse and an illustration of what might be done now to assist State Parties in their deliberations on the implications of advances in the life sciences through to the Eighth Five-Year Review Conference of the BTWC in 2016.

The Contagious Lethal H5N1 Debate

The committee chaired by Gerald Fink produced its report on *Biotechnology Research in an Age of Terrorism* in good part because of the increasing concerns about terrorism. As the report noted [4] “[B]iotech-

nolgy represents a ‘dual-use’ dilemma in which the same technologies can be used legitimately for human betterment and misused for terrorism”. Two points that are often forgotten are, first, that the committee viewed bioterrorism as only part of [5] “a wide spectrum of potentially dangerous activities” posed “by hostile individuals and nations”, and, secondly, that the committee’s first recommendation read as follows [6]:

“We recommend that national and international professional societies and related organisations and institutions create programs to educate scientists about the nature of the dual-use dilemma in biotechnology and their responsibilities to mitigate its risks.”

We will return to both of these points later.

However, the Fink Committee is chiefly remembered for two quite different points. First, it suggested that there were at least seven classes of (mainly microbiological) research that were of sufficient concern to warrant oversight prior to being undertaken or published in full after being carried out. These experiments included those which [7]:

- “1. Would demonstrate how to render a vaccine ineffective...
2. Would confer resistance to therapeutically useful antibiotics or antiviral agents...
3. Would enhance the virulence of a pathogen or render a nonpathogen virulent...
4. Would increase the transmissibility of a pathogen...
5. Would alter the host range of a pathogen...
6. Would enable the evasion of diagnostic/detection modalities...
7. Would enable the weaponization of a biological agent or toxin...”

The committee went on to note, directly after listing these categories, that “[O]ver time...it will be necessary to expand the experiments of concern to cover a significantly wider range of potential threats” and this point was fully endorsed by the subsequent Lemon-Relman Report [8] of the US National Academies.

Secondly, the Fink Committee recommended the setting up of a national committee to [9] “provide advice, guidance, and leadership for the system of review and oversight we are proposing”. This in turn led to the establishment of the National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB) which has actively endeavoured to fulfil this remit. One of the Board’s first endeavours, in 2005, concerned the publication of the sequencing and synthesis of deadly Spanish Influenza virus. They approved publication, but it should be noted that the then editor of *Science* is on record [10] as stating “So would I...have published the paper even if the NSABB have voted otherwise? Absolutely...”

So it is against that background of widespread ignorance of, and opposition to, biosecurity considerations that current concerns about H5N1 have to be understood. And this is so even though in the years after 9/11 editors of leading science journal agreed to institute a biosecurity review of publications of concern [11], grant giving organisations began to ask applicants if they had taken biosecurity issues into account [12], the InterAcademy Panel published the principles of a code of conduct related to biosecurity [13], and The Netherlands Academy of Science published a specific biosecurity code of conduct [14]. Moreover, The Netherlands code had the text of the BTWC as its first appendix, and the lead scientist in the Dutch study on H5N1 was part of the group that produced the code.

Of course, it is not possible at this stage to give a full account of what happened in these H5N1 projects and attempted publications, but certain facts are already known and allow for some conclusions to be drawn as to the utility of the oversight system. The two studies first became widely known when an article appeared in *Science* in November 2011 [15]. From this article it was clear that both projects, at the Erasmus Medical Centre in Rotterdam, the Netherlands, and at the University of Wisconsin, Madison had been funded and approved for publication by the US National Institutes of Health before they were submitted to *Science* (and *Nature*) when the NSABB became involved. The *Guardian* quoted Paul Keim, chair of NSABB, as stating [16] “[I]f this virus were to escape by error or terror, we must ask whether it would cause a pandemic” and adding that:

“The probability is unknown, but it is not zero. There are many scenarios to consider, ranging from mad lone scientists, desperate despots and members of millennial doomsday cults, to nation states wanting mutually assured destruction options, bioterrorists or a single person’s random acts of craziness.”

According to the deputy editor of *Science* about 1, 000 scientists were already familiar with the details of the Dutch study [17]. This revelation is curious, not least because the Netherlands group seems to have deviated from the national Code of Conduct on Biosecurity and its provisions on ‘Research and Publication Policy’, according to which scientists should [18]: “Screen for possible dual-use aspects during the application and assessment procedure and during the execution of research projects.”

Still, it can reasonably be argued that there has been a degree of ‘over-hype’ in regard to the capabilities of terrorists to replicate papers that report the results of cutting-edge research.

For example, one of the original experiments that caused concern early in this century was the chemical synthesis of the polio virus [19].

However, on closer examination it was found that crucial tacit knowledge, which would not have been available from the published paper, was required to replicate the synthesis [20]. The team at the University of Wisconsin-Madison [21]:

“...created a chimeric virus with the haemagglutinin protein from H5N1 and the genes from the 2009 pandemic strain of H1N1. It was an artificial version of the same process though which wild viruses shuffle their genes, known as reassortment...”

The mutant virus spread easily among ferrets, but did not retain its virulence. The work in The Netherlands caused more concern. The virus genome was first altered so that the mutant strain could easily attach to mammalian nose and tracheal cells. However, the virus could not spread between individuals through the air. To overcome the deficiency, the researchers then exposed ferrets to the strain and used nasal fluids from the already sickened animals to infect others:

“...After 10 rounds, the virus could spread through the air to infect ferrets in neighbouring cages. The genome of the airborne strain differed from the original one by just Give mutations...”

Moreover when this new mutant virus was implanted physically into the trachea or nasal passages of ferrets, the animals died. Ferrets are the surrogate organisms for such work on mammals and the use of passage through a series of animals is well known as a standard method of increasing the virulence of a pathogen. According to Michael Imperiale, a professor of microbiology and member of the NSABB, the technology of making influenza viruses from DNA clones is widely available and “while not simple, is not beyond someone with basic knowledge of molecular and cell culture techniques” [22]. This in turn implies that tacit knowledge requirements are unlikely to be as high if an attempt were made to replicate that part of the work. Moreover, the reason that so many people were thought to have knowledge of the Netherlands work was because it was presented at an international conference on Influenza research in Malta prior to being submitted for publication [23].

Throughout the period of dominance of the dual-use/bioterrorism framework of understanding the threat it has been suggested that oversight of projects and publications should be based on an assessment of the risks as against the benefits of a research project or publication. Hence the researchers who carried out these H5N1 studies have argued that their work could help in detecting the occurrence of a dangerous new virus, like the ones they created, in nature, and in the development of vaccines against such a new virus. Some scientists, however, have dismissed such claims as

‘hollow’ emphasising that the “risk/benefit ratio is essentially infinite – high risk relative to zero or near-zero benefit” [24], As an editorial in *Nature* has underscored [25]:

“In practice, the immediate benefits are minimal. Surveillance of influenza in animals is slow and patchy at best, and follow-up sequencing of samples more so.

And the mutations that we know about are likely to be outnumbered by those about which we are still ignorant...”

And, further, that:

“...Current techniques can produce vaccines only six months after a pandemic emerges. Doing so faster and in much larger quantities is the most urgent publichealth priority when it comes to planning for the next pandemic. The mutant-Glu studies contribute little to this goal...”

The calling into question of whether the H5N1 research has any benefits to society is more serious, perhaps, than many realise because the BTWC clearly bans work that has no justification for peaceful purposes. Article I of the Convention states that [26]:

“Each State Party to this Convention undertakes never in any circumstances to develop, produce, stockpile or otherwise acquire or retain:

1. Microbial or other agents, or toxins whatever their origin or method of production, of types and in quantities that have no justification for prophylactic, protective or other peaceful purposes...”

Now it may be objected that the Convention does not prohibit research, but that is to ignore what State Parties have agreed at each Review Conference in regard to Article I since 1991. As the Final Document of the Seventh Review Conference of the BTWC in December 2011 stated [27]:

“The Conference notes that experimentation involving open air release of pathogens or toxins harmful to humans, animals and plants that have no justification for prophylactic, protective or other peaceful purposes is inconsistent with the undertakings contained in Article I.”

There certainly cannot be any doubt that some of these H5N1 experiments involved demonstrating that the deadly virus was contagious through the open air from infected ferrets to uninfected ferrets. The Netherlands group made it clear that this was their objective when they pointed out that [28] “[O]ur research program aimed to test whether A/H5N1 virus could acquire the ability to spread in aerosols in mammals, following similar genetic changes as those identified in previous pandemic viruses...” Likewise, the primary goals of the US team were to “evaluate the pandemic potential

of H5N1 viruses” and “identify the molecular features required for adaptation of avian H5N1 viruses in humans” [29].

It could, of course, be objected that what State Parties referred to in their common understanding was large scale open-air tests. However, as making an influenza virus contagious through the air is effectively to weaponise it there must be reservation about such an objection. Furthermore, Article III of the BTWC states that [30]:

“Each State Party to this Convention undertakes not to transfer to any recipient whatsoever, directly or indirectly, and not in any way to assist, encourage, or induce any State, group of States or international organisations to manufacture or otherwise acquire any of the agents, toxins, weapons, equipment or means of delivery specified in Article I of the Convention.” (emphasis added)

So it has to be asked whether publication of the H5N1 studies would assist those with hostile intent in the acquisition of what is banned by Article I.

After careful deliberation and several hundreds of hours of discussion in late 2011 the NSABB reached the conclusion that these papers could not be published in full because of the risks of subsequent misuse. As one of the Board members commented on the recommendation, “We don’t want to give bad guys a road map on how to make bad bugs really bad” [31]. However, this decision was then discussed by 21 influenza experts and one ethicist at an international meeting at the World Health Organisation (WHO) and that meeting had reservations about what the NSABB had decided [32]. So upon a request by the NIH the NSABB again considered the issue at another meeting that was addressed by the senior scientists of the two groups. Following an intensive two-day discussion the members of NSABB decided that the papers should be published in full. A crucial factor for this decision was the new policy for oversight of dual-use research of concern [33], which the US Government issued on the first day of the NSABB meeting and which allowed classification of scientific work on security grounds. So, in the absence of appropriate mechanisms for disseminating research findings on a need-to-know basis, the Board was left with the option of either stopping or allowing publication, and in such circumstances they opted for the latter. One member of the Board was quoted as saying [34]:

“...the group would likely have still recommended that the studies be redacted - published in abbreviated form - but the NSABB, as others, have concluded that the option is unworkable.”

Even then, however, some members had deep concerns. The eighteen voting members of the Board were unanimously in favour of publication of the work carried out in the USA, but six voted against publication of the work done in The Netherlands. Similarly, the Dutch Government discussed whether the results of the work carried out there had created knowledge that might be too dangerous to export but eventually agreed to publication [35]. Meanwhile, one of the NSABB members recently voiced concerns about the way in which the second Board meeting (29–30 March 2012) had been organised. In a letter addressed to a senior NIH official, Professor Michael Osterholm stated that the meeting “was designed to produce the outcome that occurred” representing a very “one sided” picture of the risk/benefit of communicating the research results openly [36].

Specifically, he emphasises that “the Board received no formal or informal presentation from those on the front lines of H5N1 animal surveillance” and that the security briefing at which the risks of malevolent applications of the mutation data were discussed was “incomplete” and even “useless” [37].

Even though all of the NSABB deliberations took part behind ‘closed doors’ and were never given detailed media coverage, several Board members have commented on why they were opposed to the publication of the studies, especially the one conducted in the Netherlands. In their view, the main reason why the projects were problematic was that they fell into both the fourth and the fifth categories of research of concern listed by the Fink Committee. That is experiments that [38]:

“Would increase transmissibility of a pathogen... ” “Would alter the host range of a pathogen...”

In addition, it can be argued that making deadly H5N1 influenza contagious would also come under the seventh of Fink’s categories. That is an experiment that “[W]ould enable the weaponisation of a biological agent or toxin”. This follows because Article I.2 of the BTWC states [39] that the prohibition covers “[W]eapons, equipment or means of delivery designed to use such agents or toxins for hostile purposes or in armed conflict”, whereby contagion through the air is clearly a means of delivery.

The reported views of knowledgeable members of the NSABB in the period after the WHO meeting and before the second decision of the NSABB are instructive in trying to understand why even in the constrained situation of the second meeting some people still voted against publication of the work of the group from The Netherlands. David Relman and Stanley Lemon co-chaired the follow-up report to that of Fink [40]. Relman was reported to have said [41]:

“My bottom line: Fouchier started with a highly worrisome and sometimes lethal virus to humans and appears to have enhanced its transmissibility by the respiratory route. Nothing said in recent days changes these facts...”

And Lemon said bluntly [42]:

“The major concern has been about acquisition of the capability for aerosol transmission of the virus to a mammal.”

Now people who have looked at such experiments of concern in detail [43,44], state that it will frequently be possible for an oversight system to suggest modifications at the project proposal stage that can avoid these kinds of difficulty later.

It is, however, difficult to see how Fouchier’s experiment could have been so modified because of its stated objectives. It has to be reiterated that Fouchier has been open about the objective of the work throughout the recent public debate [45]:

“Our research program on H5N1 virus transmission, which led to submission of one of the papers that has stirred up so much recent controversy, aimed to investigate whether and how HPAI [Highly Pathogenic Avian Influenza] H5N1 virus can acquire the ability to be transmitted via aerosols among mammals and whether it would retain its virulence...”

Given the shambles amongst the scientific community it is hardly surprising that politicians have begun to step in on behalf of the wider society.

A senior US Congressman summarised the present disarray amongst life scientists with a series of questions to the White House science advisor. These questions well illustrate how little life scientists have been able to accomplish in protecting their work from hostile misuse over the last 10 years. The Congressman’s questions were [46]:

1. “How does NSABB weigh the potential risks and benefits of dual-use research? When does it advocate against publication?”
2. What systems exist to identify and, if necessary, control early stage dual-use research?
3.What is the government’s current system for disseminating legitimate dual-use research worldwide? How is that system being implemented with respect to the articles in question?
4. Is the NIH’s review system adequate to identify potentially dangerous dual-use research? Why did it fail to identify the avian flu research until it was completed and submitted for publication?”

These are very difficult questions and might lead to the conclusion that oversight really is unworkable. If that position is accepted, then there is little need for dual-use/biosecurity education of life scientists because either everything that can be done is allowed, or politicians will decide what can be done. This particular example of the creation of a contagious lethal H5N1 virus, and the difficulty of agreeing what should be done about it, should certainly give everyone pause for thought. Meanwhile, it is noteworthy that the team in the Netherlands has already “identified an addition mutation that results in ferret-to-ferret transmission without the need for repeated passage of the virus in ferrets” [47]. However, we think oversight still has a role to play both in lessening difficulties by allowing modification of individual projects, but more fundamentally, in laying the foundations for a much wider understanding of the risks and the resultant responsibilities of life scientists. Above all, for research oversight to be effective, the life science community as a whole needs to be sensitised to the dangers posed by the potential misuse of life science knowledge and to how those can be mitigated. It is to such wider understanding, awareness-raising and education that should come out of the avian influenza debate that we now turn.

The Wider Responsibilities of Life Scientists

In contrast to the narrow view of the potential dangers enclosed in the dual-use/bioterrorism framework, for over two decades there has been a well-articulated view that what is needed to prevent the militarisation of the modern life sciences is an integrated “web of preventive policies” that will persuade anyone thinking of going down that path that the costs will far outweigh the benefits [48]. Furthermore, given that there were a series of offensive biological weapons programmes by major States in the last century [49, 50] it has to be understood that these policies have to be centred on the 1975 BTWC. The web of policies would, for example, include:

- Effective intelligence; Co-ordinated export controls;
- As strong as possible BTWC implemented in-depth nationally;
- Sensible biodefence against validated threats; and
- A clear international determination to respond vigorously to any violation of the norm embodied in the prohibition regime.

What is of interest here is the State Parties’ understanding of in-depth implementation of the BTWC nationally.

Article IV of the BTWC requires that State Parties take measures to prohibit and prevent what is banned in Article I, and the meaning of ‘pre-

vent' clearly involves life scientists. At the Second Review Conference of the BTWC in 1986 State Parties agreed, in relation to Article IV, that [51]:

“The Conference notes the importance of: - inclusion in textbooks and in medical, scientific and military educational programmes of information dealing with the prohibition of microbial or other biological agents or toxins and the provisions of the Geneva Protocol [of 1925].”

And similar statements have been repeated at subsequent Review Conferences. So there is no doubt that an aware and educated life science community worldwide is essential for the strength of the prohibition regime. Clearly, there is much that such an educated and engaged community could contribute to preventing the hostile misuse of their work. For example, Synthetic Biologists have investigated measures that could help to ensure that those with hostile intent cannot easily order dangerous material from commercial companies [52].

However, it is also abundantly clear that most practicing life scientists have little or no understanding of the Convention, or of their responsibilities under the Convention. As a major Working Paper by 12 State Parties, including the USA and the UK, for the Seventh Review Conference states [53]:

“Life scientists do not often consciously consider the possibility that their work could be of relevance to a biological weapons programme or other wise misused to cause harm to people, animals or plants or to render critical resources unusable...”

Unsurprisingly, therefore, State Parties considered what might be done to raise the awareness and education of life scientists in their annual meetings in 2005 and 2008 so that scientists could become better engaged, for example, in the development of codes of conduct and oversight systems.

Indeed, in 2008 State Parties agreed on the value of a series of educational measures that would include [54]:

- i. “Explaining the risks associated with the potential misuse of the biological sciences and biotechnology;
- ii. Covering the moral and ethical obligations incumbent on those using the biological sciences;
- iii. Providing guidance on the types of activities which could be contrary to the aims of the Convention and relevant national laws and regulations and international law;
- iv. Being supported by accessible teaching materials, train-the-trainer programmes, seminars, workshops, publications, audio-visual materials...”

In their 2011 Working Paper the 12 State Parties detailed what they had done in order to carry out such awareness-raising and educational activities [55]. Additionally, nongovernmental organisations have reported their efforts to develop and make available relevant teaching materials, train-the-trainer programmes, and seminars and workshops [56]. Yet it is obvious that a great deal more will have to be done in order to elaborate and implement comprehensive national strategies on education in biosecurity so that life scientists will be in a position to contribute their expertise to preventing the future militarisation of the life sciences.

In that context, it is hardly surprising that State Parties to the BTWC at the Seventh Review Conference agreed to have a Standing Agenda Item (SAI) for their meetings through to the next review on “Review of developments in the field of science and technology related to the Convention”, and that two of the sub-items under this SAI would be [57]:

“(d) voluntary codes of conduct and other measures to encourage responsible conduct by scientists, academia and industry.

[and]

(e) education and awareness-raising about risks and benefits of life sciences and biotechnology.”

Unfortunately, what is also evident is that, given the limited time available for the annual meetings at Expert and State Party levels, and the very crowded agenda, it is unlikely that State Parties will be able to make substantive and cumulative progress on these sub-topics before the Eighth Review Conference without considerable help from the scientific community in providing input to the meetings, and analyses of the outcomes, in 2012, 2013, 2014 and 2015.

Our view is that a comprehensive strategy on awareness-raising and education will have to be developed by each State Party and its implementation carefully monitored if significant progress is to be ensured [58]. However, if progress is well reported to the annual meetings of the BTWC, there is a hope that a rapid evolution of best practices will be possible. In that regard, our own experience strongly suggests that educational programmes need to begin by adding the issues of biosecurity and dual-use to the range of topics, such as plagiarism and fraud that scientist are increasingly made aware of and cautioned about in courses on the responsible conduct of research [59]. But we also consider that this basic awareness-raising has to be supplemented, whatever the problems of teaching such material to scientists [60], with some straightforward material on how philosophers deal with ethical questions [61]. It should then be possible

for scientists to think more clearly about their responsibilities in relation to experiments that raise dual-use concerns. We have certainly found that scientists who have become aware of the potential dangers are very serious about their responsibilities in protecting the results of their work from misuse [62]. Nevertheless, as the H5N1 experiments of concern discussed here have demonstrated all too clearly, responsibility cannot be discharged solely at the level of the individual scientist's projects and publications. It is necessary that a wider framework of understanding is developed so that dual-use and bioterrorism are seen as only part of a much wider problem of protecting the life sciences from large scale militarisation. Then the much wider range of actions that can be taken will become available to the life science community as a whole. Of course, it is noteworthy that the challenge of dual-use is not unique to the life science, but arises in other fields of study, such as chemistry, as it has already been demonstrated [63].

References

1. *WHO*. [accessed 1/05/12] Cumulative Number of Confirmed Cases of Avian Influenza A(H5N1) Reported to WHO. 2012. Available at: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/
2. *Committee on Research Standards and Practices to Prevent the Destructive Application of Biotechnology*. *Biotechnology Research in an Age of Terrorism*. National Academies Press; Washington, D.C.: 2004.
3. *Meselson M*. Averting the Hostile Exploitation of Biotechnology. *The Chemical and Biological Weapons Conventions Bulletin*. 48:16–19. (2000).
4. *See reference 1*, page .
5. *See reference 1*, page .
6. *See reference 1*, page .
7. *See reference 1*, page .
8. *Committee on Advances in Technology and the Prevention of their Application to Next Generation Biowarfare Threats*. *Globalization, Biosecurity, and the Future of the Life Sciences*. National Academies Press; Washington, D.C.: 2006.
9. *See reference 1*, page .
10. *Kennedy D*. Better Never Than Late. *Science*. 2005; 310:195. [PubMed: 16223986]
11. *Journal Editors and Authors Group*. Uncensored Exchange of Scientific Results. *PNAS*. 2003; 100, 4:1464. [PubMed: 12590129]
12. *Wellcome Trust*. [accessed 1/05/12] Position Statement on Bioterrorism and Biomedical Research. See Available at: <http://www.wellcome.ac.uk/About-us/Policy/Policy-and-positionstatements/WTD002767.htm>
13. *IAP*. [accessed 1/05/12] Statement on Biosecurity. 2005. Available at: <http://www.interacademies.net/File.aspx?id=5401d>
14. *Biosecurity Working Group*. *A Code of Conduct for Biosecurity*. Royal Netherlands Academy of Arts and Science; Amsterdam: 2007.

15. *Enserink M.* [accessed 26/04/12] Scientists Brace for Media Storm around Controversial Flu Studies. ScienceInsider. Nov 23. 2011 Available at: <http://news.sciencemag.org/scienceinsider/2011/11/scientists-brace-for-media-storm.html>.
16. *Miller N.* [accessed 26/04/12] Scientists Call for Curbs on Own Research on Deadly Bird Flu Virus. The Guardian. Feb 3. 2012 Available at: <http://www.guardian.co.uk/world/2012/feb/03/bird-flu-virus-scientists-warning>.
17. *Roos R.* [accessed 1/05/12] Live Debate Airs Major Divisions in H5N1 Research Battle. CIDRAP. Feb 3. 2012 Available at: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/influenza/avianflu/news/feb0312webinar-jw.html>.
18. *See reference 14*, page .
19. *Wimmer E.* The Test-Tube Synthesis of a Chemical Called Polio. EMBO Reports. 2006; 7:S3–S9. [PubMed: 16819446].
20. *Vogel K. M.* Framing Biosecurity: an alternative to the biotech model? Science and Public Policy. 2008; 35(1):45–54.
21. *Young E.* [accessed 1/05/12] The Risks and Benefits of Publishing Mutant Flu Studies. Nature: News: Explainer. Mar 7. 2012 Available at <http://www.nature.com/news/the-risks-and-benefitsof-publishing-mutant-flu-studies-1.10138>.
22. [accessed 1/05/12] See Deliberating Over Danger. The Scientist. Apr 1. 2012 Available at: <http://the-scientist.com/2012/04/01/deliberating-over-danger/>
23. *Mackenzie D.* [accessed 26/04/12] Five Easy Mutations to Make Bird Flu a Lethal Pandemic. The New Scientist. Sep 26. 2011 Available at: <http://www.newscientist.com/article/mg21128314.600-five-easy-mutations-to-make-bird-flu-a-lethal-pandemic.html>.
24. *See reference 22.*
25. *Editorial.* Facing up to Flu. Nature. 2012; 482:131.
26. [accessed 1/05/12] For the full text of the BTWC. see www.opbw.org
27. *Seventh Review Conference of the States Parties to the Convention on the Prohibition of the Development, Production and Stockpiling of Bacteriological (Biological) and Toxin Weapons and on their Destruction. Final Document, BWC/CONF. Vol. VII/7. United Nations; Geneva: 2012. p. 10*
28. *Herfst S. et al.* The Future of Research and Publication on Altered H5N1 Viruses [advanced version]. Journal of Infectious Diseases. Mar 27.2012
29. *Kawaoka Y.* Transmission of an Influenza Virus Possession H5 hemmagglutinin via respiratory Droplets in Ferrets; Presentation given at International Symposium H5N1 Research: Biosafety, Biosecurity and Bioethics; London: The Royal Society; Apr 3–4. 2012.
30. *See reference 26.*
31. *See reference 15.*
32. *Vogel G.* [accessed 1/05/12] Flu Experts – and One Ethicist – Debate Controversial H5N1 Papers. ScienceInsider. Feb 16. 2012 Available at: <http://news.sciencemag.org/scienceinsider/2012/02/flu-expertsand-one-ethicist.html>.
33. *United States.* [accessed 1/05/12] United States Government Policy for Oversight of Life Sciences Dual Use Research of Concern. 2012. Available at:

- http://oba.od.nih.gov/oba/biosecurity/pdf/united_states_government_policy_for_oversight_of_durc_final_version_032812.pdf.
34. *Branswell H.* US Biosecurity Panel Clears Publication Path for Controversial Bird Flu Studies. The Canadian Press; Mar 30. 2012 Available at: <http://www.cbc.ca/news/technology/story/2012/03/30/bird-flu-studies-publication.html>.
 35. *Enserink M.* Will Dutch Allow 'Export' of the Controversial Flu Study. Science. Apr 20.2012 336:285. [PubMed: 22517831] See also Enserink, M. [accessed 1/05/12] Dutch Government OK's Publication of H5N1 Study. ScienceInsider. Apr 27. 2012 Available at: <http://news.sciencemag.org/scienceinsider/2012/04/dutch-government-oks-publication.html>.
 36. *Maher B.* [accessed 1/05/12] Bias Accusation Rattles US Biosecurity Board. Nature News. Apr 14. 2012 Available at: <http://www.nature.com/news/bias-accusation-rattles-us-biosecurity-board-1.10454>
 37. *Ibid.* See Letter from Michael Osterholm to Amy Patterson (NIH)
 38. *Cohen J., Malakoff D.* [accessed 1/05/12] NSABB Members React to Request for Second Look at H5N1 Flu Studies. ScienceInsider. Mar 2. 2012 Available at: <http://news.sciencemag.org/scienceinsider/2012/03/nsabb-members-react-to-request.html>.
 39. *See reference 26.*
 40. *See reference 7.*
 41. *See reference 38.*
 42. *Ibid.*
 43. *Steinbruner J. et al.* Controlling Dangerous Pathogens: A Prototype Protective Oversight System. CISS, University of Maryland; 2007. See
 44. *Rath J.* Mutant Flu: Assessing Biosecurity Risks. Nature. Feb 23.2012 482:470. [PubMed: 22358821].
 45. *Fouchier R. A. M. et al.* Restricted Data on Influenza H5N1 Virus Transmission. Science. Feb 10.2012 335:662–663. [PubMed: 22267582]
 46. *Malakoff D.* [accessed 1/05/12] Senior U.S. Lawmaker Leaps into H5N1 Flu Controversy. SeniorInsider. Mar 4. 2012 Available at: <http://news.sciencemag.org/scienceinsider/2012/03/senior-us-lawmaker-leaps-into-h5.html>
 47. *See reference 36.*
 48. *Pearson G.* Prospects for Chemical and Biological Arms Control: The Web of Deterrence. Washington Quarterly. 1993; 16, 2:145–162.
 49. *Geissler E., van Courtland Moon J. E.,* editors. Biological and Toxin Weapons: Research, Development and Use from the Middle Ages to 1945. Oxford University Press; Oxford: 1999.
 50. *Wheelis M., Rozsa L., Dando M.* Deadly Cultures: Biological Weapons since 1945. Harvard University Press; Cambridge MA: 2006.
 51. [accessed 1/05/12] For full texts of the outcomes of BTWC Review Conferences. see www.opbw.org.
 52. *Garfinkel M. et al.* Synthetic Genomics: Options for Governance. J Craig Venter Institute, CSIS, MIT; 2007.
 53. *Australia. et al.* Possible approaches to education and awareness-raising among life scientists. BWC/CONF.VII/WP20/ Rev.1. United Nations; Geneva: 2011.

54. *Report of the Meeting of State Parties to the Biological and Toxin Weapons Convention*. BWC/ MSP/2008/5. United Nations; Geneva: Dec. 2008
55. *See the Annex* to reference 52.
56. *See, for example*, Minehata M. et al. [accessed 2/05/12] Implementing Biosecurity Education: Approaches, Resources and Programmes [online version]. *Science and Engineering Ethics*. Nov 8. 2011 Available at: <http://www.springerlink.com/content/j6137g35567j7731/>
57. *See reference 27*, page .
58. *See NSABB*. [accessed 1/05/12] Strategic Plan for Outreach and Education on Dual Use Research Issues. 2008. Available at: http://oba.od.nih.gov/biosecurity/biosecurity_documents.html.
59. *Committee on Science, Engineering and Public Policy*. *On Being a Scientist: A Guide to Responsible Conduct of Research*. 3rd ed. National Academies Press; Washington DC: 2009.
60. *Johnson J*. Teaching Ethics to Science Students: Challenges and a Strategy. In: Rappert, B., editor. *Education and Ethics in the Life Sciences*. Australian National University E Press; 2011.
61. *Huff C., Frey W*. Moral Pedagogy and Practical Ethics. *Science and Engineering Ethics*. 2005; 11:389–408. [PubMed: 16190280]
62. *Whitby S*. Strengthening the Biological Weapons Convention: Preserving Academic and Scientific Freedom [online]. *Science, People and Politics*. 2012; 3:2.
63. *See Dando M*. Help or Harm? [online]. *Chemistry World*. 2012; 9:5. Available at: <http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2012/May/help-or-harm.asp>.

A NOVEL MECHANISM CONTROLLING THE GROWTH OF HEMOSTATIC THROMBI

V. K. LISHKO, I. S. YERMOLENKO,
N. P. PODOLNIKOVA, T. P. UGAROVA

From the School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ USA

Current knowledge of the mechanisms of blood coagulation does not provide an answer to one pivotal question: why is, in contrast to a pathological thrombus, the growth of normal hemostatic clot after blood vessel injury suddenly terminated? In the present paper, we summarize the results of our investigations that give an answer to this question. We show that the surface of fibrin clot in the circulation is coated with a thin metastable layer of fibrinogen which is not able to support adhesion of blood cells. Consequently, platelets and leukocytes, the cells expressing adhesive integrins, are incapable of consolidating their grip on the surface and washed away by blood flow, thereby preventing the thrombus propagation. The cells that escaped this fibrinogen shield and reached a solid fibrin matrix use an additional mechanism – the ability to activate plasminogen bound either to the surface of cells or to fibrin. Plasmin formed at the interface between the cells and the clot locally degrades fibrin resulting in the fragmentation of the surface rendering it unstable, non-adhesive and therefore non-thrombogenic. Thus, the growth of hemostatic thrombus is halted by two mechanisms, fibrinogen- and plasminogen-dependent, both of which are based on the same principle – the generation of the mechanically unstable, non-adhesive surface.

The formation of a hemostatic thrombus during blood vessel injury is a highly regulated event. The process ensures that a blood clot is sufficiently strong to seal the breach and prevent the loss of blood, however does not cause vessel occlusion and thrombosis. Hemostasis and thrombosis are related events, but the former is a normal protection from bleeding after injury, while the latter is a consequence of a disease. And the structure of the plug at the site of injury and pathological thrombus is strikingly different. The diagram (Fig. 1) shows a composition of blood clot. It is formed mainly from aggregated platelets and fibrin. The process starts with accumulation of platelets at the site of injury. Tissue factor is expressed immediately followed by activation of thrombin and fibrin formation. In the end of the process, the surface of the thrombus is covered with a fibrin cap, the accumulation of fibrin reaches a plateau and the growth of the entire thrombus is stabilized [1–3]. Using antibody against fibrin and platelets we could see (Fig. 2) the formation of fibrin layer which shields the platelet plug.

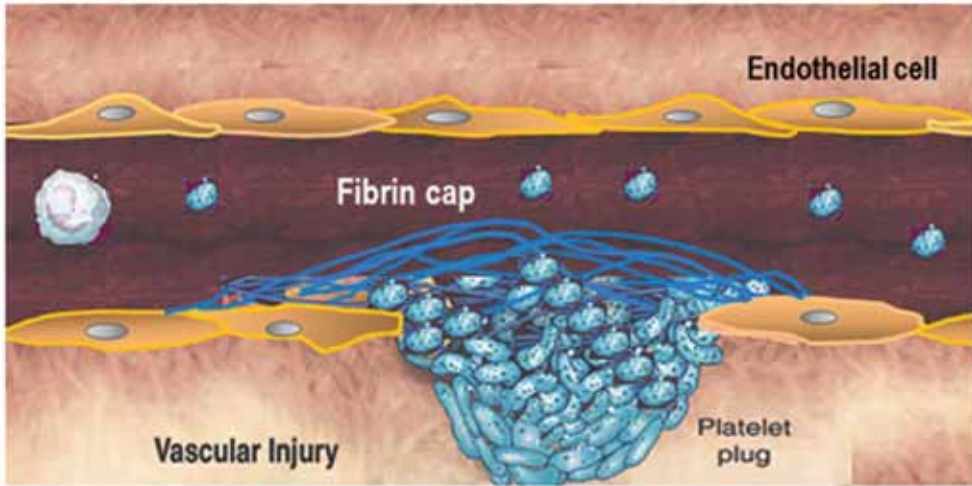


Fig. 1. Composition of normal hemostatic thrombus which is formed in response to vascular injury

While this hemostatic process has been extensively studied for more than a century, many questions remain. The main unanswered problem is how the growth of hemostatic thrombus in a high-pressure circulatory system is contained and what mechanisms limit its propagation. It is well known that after the fibrin clot covers the platelet plug, only very few platelets and leukocytes stick to its surface [4–7]. This finding is puzzling in light of the fact that fibrin is highly adhesive for platelets, at least in the experiments performed *in vitro*. Regardless, it seems obvious that fibrin deposited on the surface of haemostatic clots *in vivo* must not be adhesive because if not curtailed, uncontrollable platelet adhesion can readily lead to their activation and thrombus propagation. Obviously, continuous thrombus growth would lead to pathological thrombosis. Likewise, adhesion of



Fig. 2. Formation of fibrin cap on the surface of thrombus. Platelet plug was formed on collagen by plasma under flow. The clot was labeled with fluorescent antibody against platelets (red) and against fibrin (green)

leukocytes, which are known to contain potent fibrinolytic enzymes, must be regulated to allow early hemostasis to proceed unchallenged until the growth and stability of the blood clot is established. Therefore, a proper balance between adhesive and anti-adhesive mechanisms operating on the surface of fibrin clots in circulation may play an important role in the control of thrombus formation, stability, and timely dissolution. In spite of the obviousness of this idea, the fact that the surface of fibrin clots in circulation is not adhesive for blood cells is unappreciated.

Another unresolved question is why the antiadhesive mechanisms that effectively halt the growth of normal hemostatic thrombi fail in pathological situations. Hemostasis and thrombosis are related events in that they both trigger similar molecular and cellular mechanisms; yet, thrombotic episodes often lead to an uncontrollable growth of blood clots resulting in vascular occlusion. Furthermore, not only their outcomes vary, but it is uncertain why the morphology of hemostatic and pathologic thrombi is strikingly different. It is well known that clots formed in the arterial diseases and in deep vein thrombosis invariably manifest a laminated structure with alternating layers of aggregated platelets and fibrin enmeshed with erythrocytes (so called, lines of Zahn, Fig. 3).

In this paper, we review our recent findings that support the idea for the existence of a universal mechanism that limits uncontrolled expansion of hemostatic clots in circulation and may be responsible for restraining their premature lysis. We propose that a factor which determines the non-thrombogenic nature of blood clots and also guards their integrity in early hemostasis is the limited adhesiveness of their surface. As such, this mechanism represents a new aspect of hemostasis.



Fig. 3. The structure of arterial thrombus consists of alternate layers of aggregated platelets (white) and plasma clot with captured red blood cells (red). From <http://library.med.utah.edu>

The discovery was born from a very simple cell adhesion experiment in which fibrinogen is used as a ligand for cellular integrins. In these assays, cells are added to the wells coated with fibrinogen or other proteins. After some time, cells are washed away and adherent cells are counted. We observed that when fibrinogen is adsorbed on the surface at increasing concentrations, adhesion of platelets and leukocytes exhibits an unusual peak-like behavior (Fig. 4) [8]. Cell adhesion is maximal at low concentrations of fibrinogen and then sharply declines as more fibrinogen is adsorbed on the surface. This behavior is counter-intuitive because, typically, the increase in the density of adsorbed ligands results in the increased adhesion. Yet, fibrinogen adsorbed at high density is virtually nonadhesive. This abnormal behavior is exhibited only by fibrinogen, but not by other plasma proteins. For example, adhesion of cells to immobilized fibronectin exhibits a normal dose-dependent pattern (Fig. 4).

Based on the initial analyses of the “adhesion peak”, we hypothesized that fibrinogen adsorbed at low concentrations is attached directly to the solid surface. Therefore, cells that engage such molecules would adhere strongly. We further hypothesized that fibrinogen adsorbed at higher concentrations would bind to the molecules that have already been immobilized on the surface forming a second, more flexible layer. Thus, these cells would adhere to the adhesive layer consisting of loosely bound fibrinogen

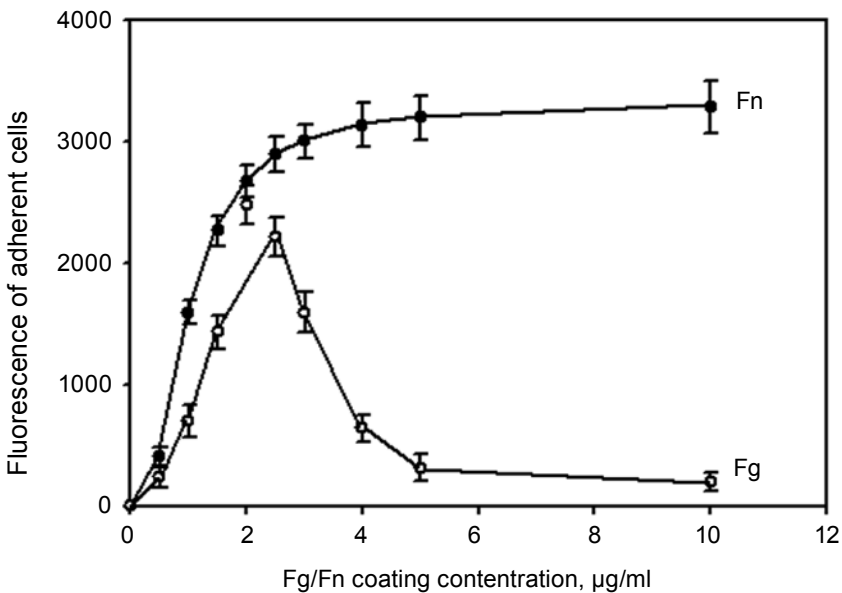


Fig. 4. Adhesion of monocytic cells to fibrinogen and to fibronectin. Effect of protein coating concentration on cell adhesion

molecules and be less capable of consolidating their grip on this “fake” substrate, and detach when flow is applied.

Since fibrinogen molecules do not self-associate in solution, there should be a trigger that initiates this process. Indeed, fibrinogen adsorbed on the surface undergoes conformational changes and acquires the properties of fibrin [9–12]. Hence, upon its immobilization, unfolded fibrinogen may generate the fibrinogen-binding activity. To characterize fibrinogen interactions, we determined the dissociation constants of its complexes using surface plasmon resonance (SPR). Intact fibrinogen was coupled to the chip, and the SPR profiles across a range of fibrinogen concentrations flowed over the protein surfaces were examined. No binding of soluble fibrinogen to intact fibrinogen was detected. However, when intact fibrinogen on the chip was treated with SDS or urea, it formed a complex with intact soluble fibrinogen with a K_D of 2.1 μM which was similar to that obtained for the interaction of fibrinogen and fibrin (1.47 μM) [8]. Thus, an initial contact of fibrinogen with various surfaces may initiate the process of its self-assembly.

The surface of blood clots in circulation is continuously exposed to high concentrations of fibrinogen. It is well established that fibrinogen forms complexes with fibrin and can self-associate without thrombin activation, forming aggregates. Therefore, by virtue of its ability to interact with fibrin clots, fibrinogen can be deposited on their surface. We found that similar to adsorption on hard surfaces, fibrinogen deposited on the surface of fibrin clots imparts them antiadhesive properties [8, 13]. Notably, when clots are pretreated with soluble fibrinogen, it accumulates in a thin superficial layer of the clot (Fig. 5A) [14]. Fig. 5B illustrates adhesion of leukocytes to fibrin clot under flow. In this experiment, cells flow through a capillary made in the fibrin gel. While a massive accumulation of adherent cells is observed in the buffer, the presence of a physiological concentration of fibrinogen strongly reduces adhesion. Taken together, these experiments led us to the idea that adsorption of fibrinogen somehow modifies the surfaces rendering them nonadhesive.

Although attractive, the idea that immobilization of fibrinogen on the surfaces results in its self-assembly and the formation of the layer required independent experimental evidence. We used atomic force microscopy (AFM) to demonstrate the ability of fibrinogen to form a multilayer matrix and measured the adhesiveness of this structure. Visualization of fibrinogen deposited on the surface showed that as the concentration of fibrinogen increases, its adsorption changes from a monolayer, in which the molecules are clearly discernible and attached directly to the surface, then to the bilayer and then to the material which has an appearance of a thick soft matrix (Fig. 6) [15]. Using nanolithography, which is one of the

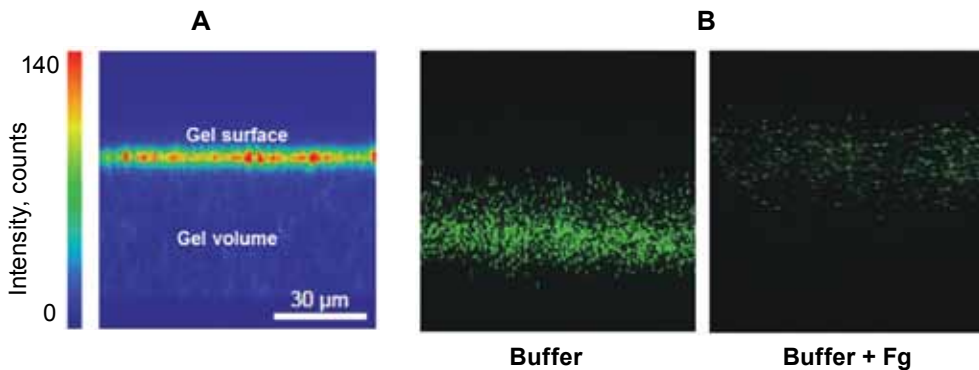


Fig. 5. Accumulation of fibrinogen on the surface of fibrin. Confocal image of fibrin gel incubated with the solution of fluorescent labeled (Alexa-488) fibrinogen (A). Effect of soluble fibrinogen on adhesion of monocytic cells to fibrin under flow conditions. Suspension of calcein-labeled U937 cells with or without fibrinogen (2.0 mg/ml) were perfused through capillary casted in fibrin gel (B)

capabilities of AFM that allows us to scratch the deposited fibrinogen material and determine its thickness we were able to calculate the number of layers in the fibrinogen matrix. Given that a single fibrinogen molecule has a height of 1.2 nm [16] and the matrix that is deposited at high concentrations has a height of about 7-8 nm, we conclude that the matrix contains approximately 7 layers.

With the data indicating that adsorption of fibrinogen on various surfaces indeed results in its deposition as a multilayer matrix, the question was why the assembled multilayer is much less adhesive than the monolayer. Using AFM-based force spectroscopy, we found that there is a correlation between the growth of the fibrinogen matrix and its adhesiveness. As soon as fibrinogen is deposited in the form of bilayer, its adhesiveness sharply declines (Fig. 7A) [15]. The subsequent increase in the number of layers results only in an incremental decrease in adhesion.

Why does fibrinogen multilayer limit cell attachment? Fig. 7B and 7C show how strikingly different is the morphology of monocytic cells on the fibrinogen monolayer and multilayer. In the first case, the cells spread and adhere strongly. On the multilayer, however, they remain round and did not engage many adhesion sites. Scanning microscopy of platelets demonstrate similar differences in the cell shape when they adhere to the “naked” fibrin gel or the gel coated with soluble fibrinogen (Fig. 7D and 7E) [13, 17].

This phenomenon can be explained by the properties of adhesion receptors, integrins, which provide a physical link between the cytoskeleton and the surrounding matrix. Increasing evidence suggests that integrins participate in these processes by responding and transmitting mechanical

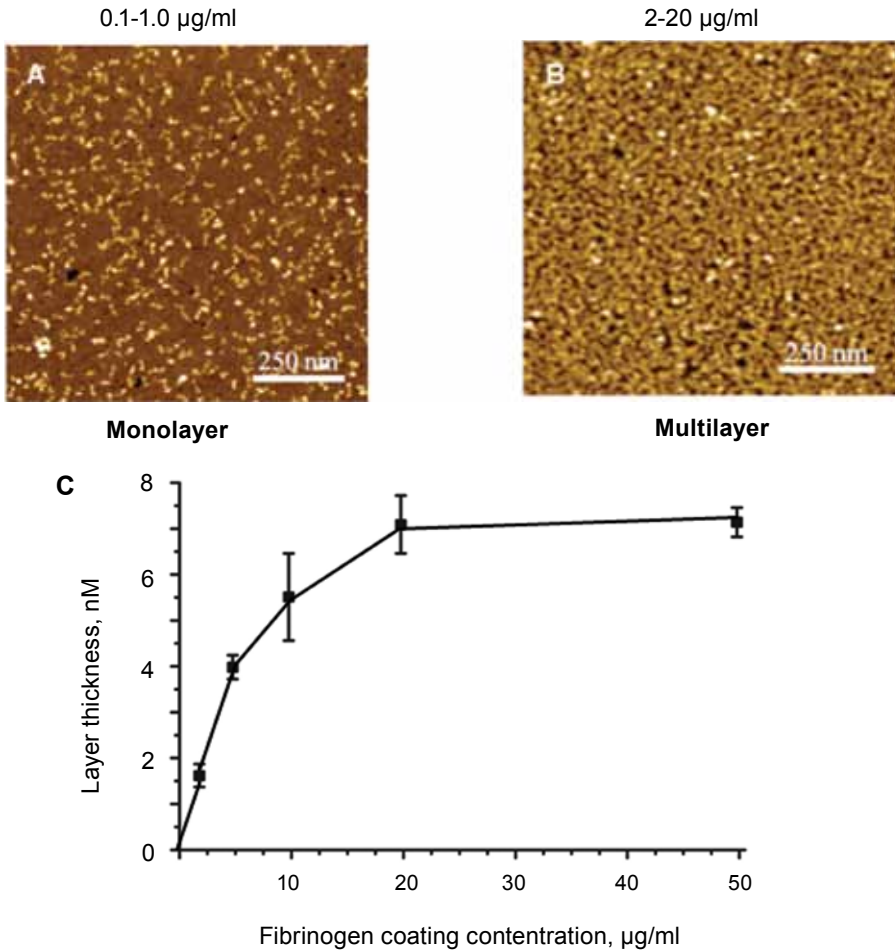


Fig. 6. Atomic force microscopy based imaging of fibrinogen adsorbed on mica at coating concentration 0.1-1.0 µg/ml, monolayer (A) and 2-20 µg/ml, multilayer (B). Dependence of the thickness of fibrinogen layer on coating concentration (C)

stresses across the plasma membrane. Physical forces sensed by integrins are transduced into intracellular chemical signals which, in turn, result in changes of cell behavior. These forces are developed during cell adhesion when integrins engage their ligands in the extracellular matrix. As cells attach, they pull on their surroundings, probing the rigidity of substrates. Therefore, the physical properties of extracellular matrices appear to represent the main signal used by cells to probe adhesiveness of the surface. Rigid surfaces generate strong signals and, as a result, firm adhesion and vice versa, the cells that engage soft matrices are not capable to initiate sufficiently strong signaling and attach weakly. When integrins pull on the

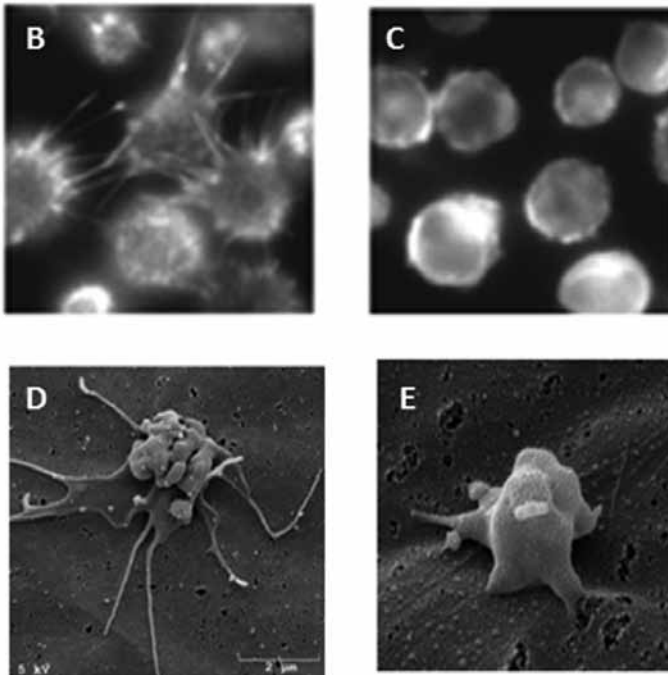
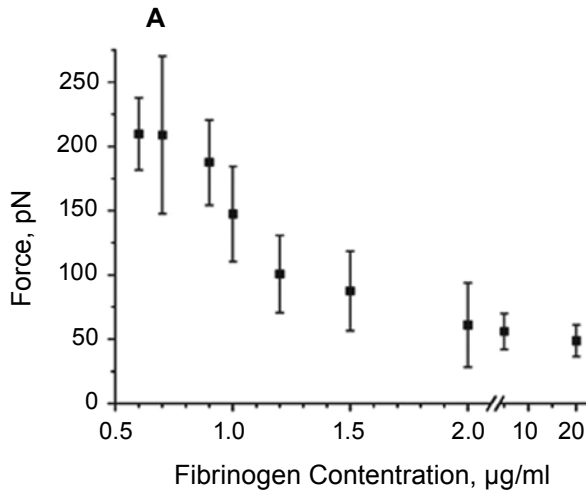


Fig. 7. Dependence of adhesion forces developed between the AFM tip and concentration of coated fibrinogen (A). Visual microscopy of adherent monocytic cells that spread on monolayer of fibrinogen (B) and stay round on the non-adherent surface of the multilayer (C). Scanning electron microscopy of adherent spread platelets (D) and non-adherent round cells (E) on mono- and multilayer correspondingly

fibrinogen monolayer, which can be viewed as a non-extensible rigid substrate because the fibrinogen molecules are directly attached to the hard surface, this substrate does not readily yield and this can generate strong pulling forces sufficient to induce strong signaling leading to cell spreading and strong adhesion. Fibrin can also be viewed as a non-extensible substrate because all the fibers are interconnected. In contrast, when a cell pulls on the fibrinogen multilayer, which is basically an extensible soft matrix, the linkages yield because the layers separate and it prevents force generation and activation of signaling molecules required for cell spreading. Under applied force as it occurs in the circulation, such cells would be easily washed away by flow.

The explanation for this behavior was obtained in the experiments in which we compared the force-distance curves generated on the fibrinogen monolayer or bilayer. One of the parameters that can be extracted from these curves is the adhesion length which is a length when the AFM tip begins to retract from the surface but is still in contact with the substrate. The analyses of adhesion lengths demonstrated that while the fibrinogen monolayer is virtually non-extensible (0.1 nm) the bilayer can be extended to 3.5 nM, suggesting that the molecules held by weak interactions in two layers can be separated. Thus, a simple transition from the monolayer to bilayer initiates a sharp decrease in adhesion forces. Hence, the fibrinogen bilayer represents a minimal structural unit responsible for the formation of nonadhesive fibrinogen matrix. Since the concentration of fibrinogen in the circulation is high it apparently is always deposited as a multilayer. Therefore, the second parameter which is useful in the characterization of the physical properties of the fibrinogen matrices is the maximal interaction length. As the AFM tip retracts from the surface, it pulls the fibrinogen matrix producing multiple rupture events until it finally loses the contact with the matrix. The point where the AFM tip loses the contact with the matrix is defined as the maximal interaction length. The interaction length for the fibrinogen multilayer was determined to be about 60 nm, i.e. the fibrinogen matrix that is deposited as a 7-nm layer can be extended up to 8-fold of its initial height under the applied tensile force. This remarkable property of the multilayer fibrinogen should certainly impact integrin-mediated cell adhesion.

Indeed, the data of molecular force spectroscopy are supported by experiments using single cell force microscopy [15]. In these experiments, a single cell is attached to a tipless AFM cantilever and the optical setup allows for constant monitoring of the cell during each approach-retraction cycle. In our experiments, we used cultured monocytic cells or cells transfected with leukocyte and platelet integrins. The surface of mica is coated with different concentrations of fibrinogen to obtain a monolayer or a

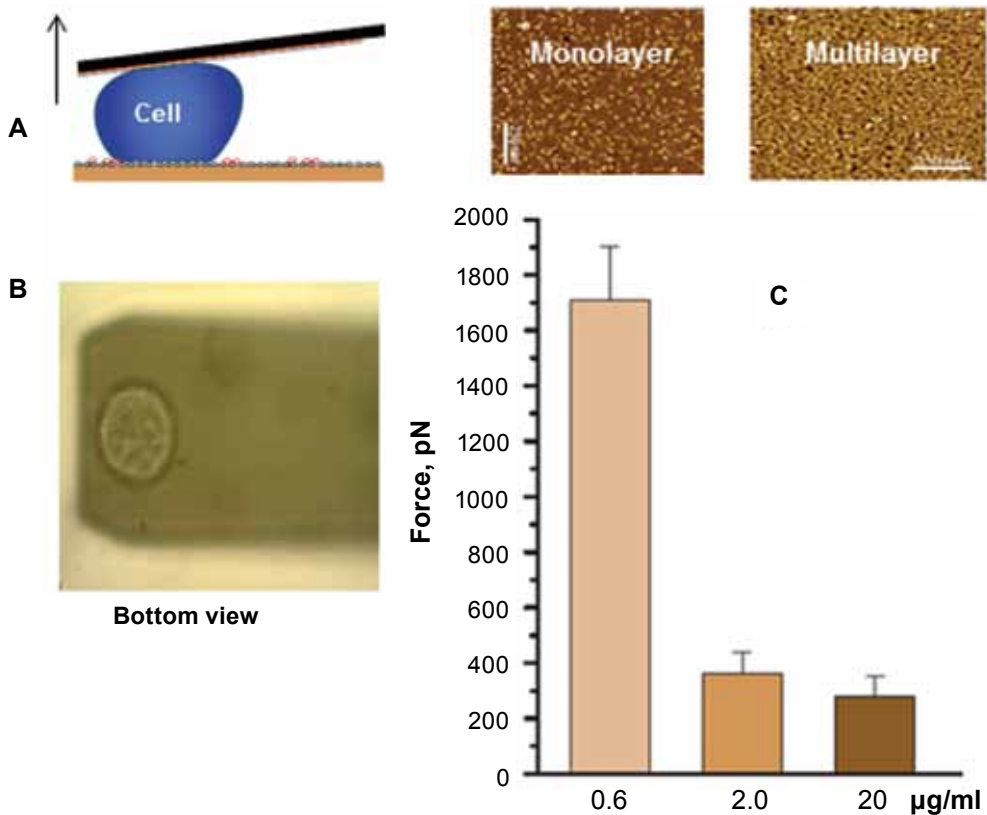


Fig. 8. Diagram of single cell force microscopy experiment: monocytic cell is covalently bound to cantilever and attached to fibrinogen substrate (A); bottom view (B); dependence of detachment force on the structure of fibrinogen coating (C)

multilayer. The cell is brought in contact with the fibrinogen matrix and then detached (Fig. 8). The maximal forces required to detach a cell from a substrate are again the highest when a cell is attached to the fibrinogen monolayer whereas the multilayer develops low adhesion forces with cells. Thus, the combined AFM-based strategy not only confirmed our initial hypothesis but provided unique insights into the mechanisms underlying the construction of the new nanoscale biological material and origin of its potent antiadhesive properties. In our most recent study, we showed that the flexible α C regions of the fibrinogen molecules grasp each other during the multilayer construction providing thus the molecular basis for its self-assembly [17].

Dependence of cell adhesion on the substrate rigidity prompted us to explore other mechanisms that potentially could prevent cell accumula-

tion at the site of injury. Another plasma protein, plasminogen, interacts with fibrin, is present in plasma at a relatively high concentration and could potentially modify the surface of fibrin clots. Furthermore, affinity of plasminogen for fibrin increases when the surface of a clot is “nicked” with plasmin, resulting in the generation of new binding sites and strong superficial accumulation of plasminogen. In addition, various cells, including leukocytes and platelets, can assemble and activate plasminogen on their surface. Similar to fibrinogen, plasminogen accumulates in a thin superficial layer of fibrin; as a consequence, fibrin lysis is restricted to a very narrow zone from the clot surface [18]. Therefore, it was reasonable to assume that when blood cells contact a clot, they activate fibrin- or cell-bound plasminogen, resulting in lysis of the superficial fibrin layer, its fragmentation and destabilization of the surface. Hence, such plasminogen shell could potentially influence cell adhesion.

In a series of experiments, we showed that binding of plasminogen to fibrin inhibits cell adhesion and that the conversion by leukocytes and platelets of fibrin-bound plasminogen into plasmin is the mechanism responsible for this antiadhesive effect [14, 19]. Furthermore, plasminogen exerts the antiadhesive effect not only when it binds to the surface of fibrin clots but when it has been added to cells (Fig. 9). Since many cells, including U937 that we used in our experiments, assemble the components of plasminogen activation system and the receptor for plasminogen activator uPA, the antiadhesive effect arises from the plasmin activity generated by cells. Indeed, the addition of PPACK (the inhibitor of serine proteases) to cell suspension completely restores adhesion. In addition, tranexamic acid, which is known to interact with lysine-binding sites of plasminogen and prevents its binding to U937 cells, almost completely abolished the inhibitory effect of plasminogen.

When fibrin gels were first treated with plasminogen and then washed to remove non-bound plasminogen, inhibition of adhesion was ~90% as compared with non-treated gels. Antiadhesive effect of plasminogen is concentration-dependent, with an IC_{50} 0.5 μ M which corresponds to the range of K_d values (0.3-1.2 μ M) previously reported for the interaction of plasminogen with fibrin clots or with fibrin immobilized on plastic. Thus, in both systems, when present in the solution or adsorbed on the fibrin surface, plasminogen is capable of blocking cell adhesion due to its conversion to plasmin. It is important to note that in the latter case, activation of plasminogen takes place at the interface between fibrin and adherent cells.

In addition to leukocytes, platelets adhere to fibrin via an integrin-dependent mechanism and assemble the components of the plasminogen system, including plasminogen and plasminogen activators uPA and tPA. Therefore, we have sought to examine whether activation of fibrin-bound

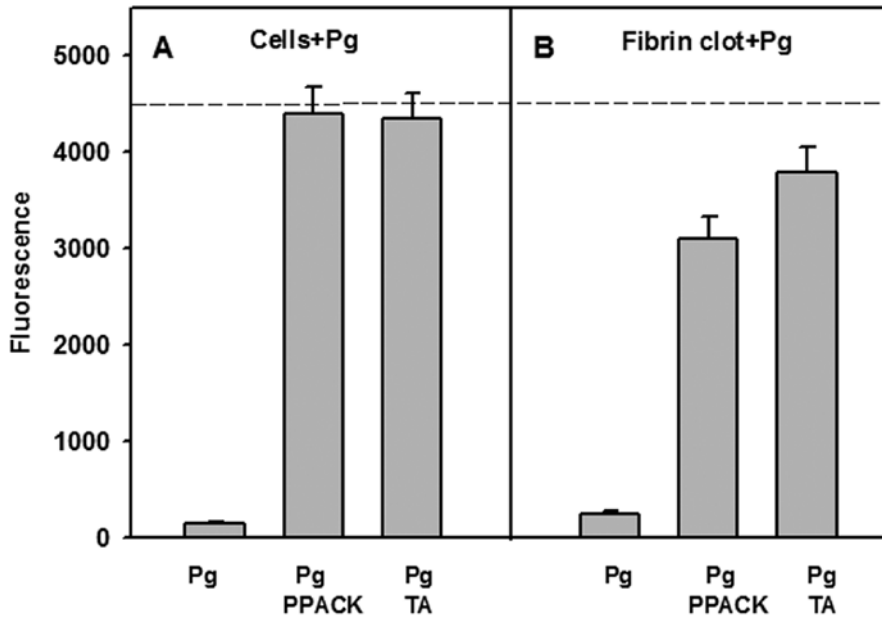


Fig. 9. Effect of plasminogen on adhesion of monocytic cells to fibrin clots. (A) – Cell adhesion when plasminogen was adsorbed on cells and added to fibrin with or without PPACK or tranexamic acid; (B) – Cell adhesion when plasminogen was adsorbed on the fibrin clot in the presence or in the absence of PPACK or tranexamic acid. A dotted line shows control cell adhesion in the absence of plasminogen

plasminogen by platelets can alter their adhesion in the same way as we observed for leukocytes. However, coating of the fibrin gel with plasminogen did not decrease platelet adhesion (Fig. 10A). This was in marked contrast to U937 cells, whose adhesion was abolished by this procedure (Fig. 10B). To understand the difference between adhesion of platelets and that of U937 cells, we measured plasmin activity generated during adhesion of these cells to plasminogen-treated fibrin. Whereas plasmin was generated by U937 cells, no activity was detected with platelets isolated from the platelet-rich plasma. However, the addition of tPA to platelet suspension resulted in the generation of plasmin and inhibition of platelet adhesion to plasminogen-coated fibrin (Fig. 10). Also, in initial experiments, we verified that resting monocytes isolated from peripheral blood did not activate plasminogen and adhere to fibrin gel strongly with or without adsorbed plasminogen. But when suspension of monocytes was pre-incubated with tPA, the loss of monocyte adhesion coincided with the production of plasmin. These results indicate that monocytes and platelets are capable of activation fibrin-bound plasminogen to plasmin in the presence of plas-

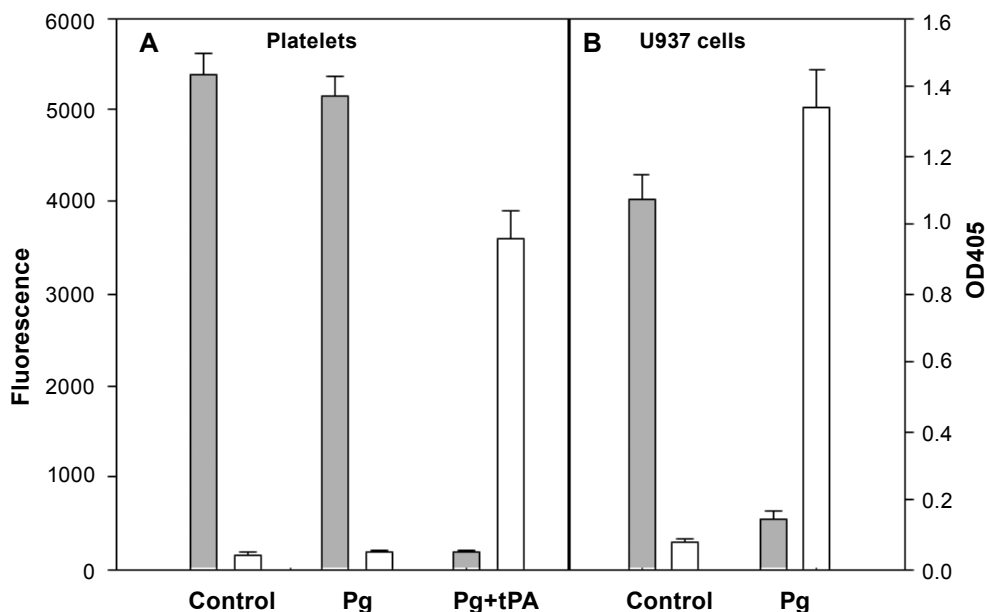


Fig. 10. Relationship between adhesion of platelets (A) and monocytic cells (B) to plasminogen-coated fibrin gel and their ability to activate plasminogen. Grey bars show the fluorescence of adherent cells (left ordinate). Clear bars show (right ordinate) plasmin activity of platelets and monocytic cells incubated with or without plasminogen

minogen activators the concentration of which rises during vascular injury and thrombus formation.

To demonstrate the effect of plasminogen under permanent shear forces, a situation more relevant to physiologic conditions, we used a flow chamber consisting of a capillary performed within the fibrin gel. Suspensions of U937 cells containing plasminogen were perfused at a flow rate between 25 and 350 sec^{-1} . After perfusion, the tubes were flushed with the buffer to remove non-adherent cells. As shown in Fig. 11, in the presence of plasminogen, adhesion is markedly reduced. In fact, fibrin gel perfused with plasminogen retained only few cells.

The above experiments showed that cell attachment to fibrin bound plasminogen causes rapid generation of plasmin, which degrades the surface of fibrin clots rendering them non-adhesive. Remarkably, the surfaces remains non-sticky for the second round of adhesion of U937 cells, even in the presence of PPACK or tranexamic acid. Moreover, platelets which do not generate plasmin in the absence tPA, also do not adhere to the "postadhesion" gels. These results strongly indicate that during the second

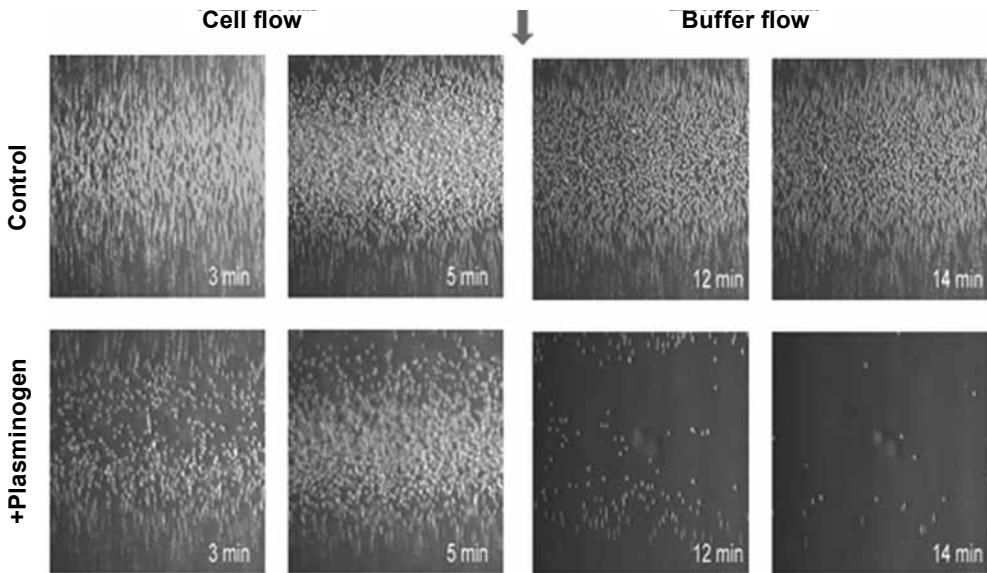


Fig. 11. Effect of plasminogen on adhesion of monocytic cells to fibrin gel under flow condition. The cells were suspended in a buffer with or without (control) plasminogen and perfused through the fibrin gel containing the inner capillary at a flow rate 0.1 ml/min for 5 min. After this time, the capillary were flushed for additional 12-14 min to remove non-adherent cells. Adherent cells were viewed in microscope at 10x objective

round of adhesion, plasmin *per se* is not responsible for the antiadhesive effect. Also, plasmin-mediated cleavage of cell surface integrins does not contribute to the defective cell adhesion. Therefore, the structural alteration of the surface of fibrin produced by plasmin generated by cells during the first round of adhesion is responsible for the inability of clots to support subsequent cell adhesion.

To assess the extent of proteolysis, we determined the amount of fibrin cleaved by generated plasmin. The amount of digested fibrin was estimated by measuring radioactivity released in the solution from gels prepared from ¹²⁵I-labeled fibrinogen after adhesion of U937 cells. It was found that only approximately 0.2% of fibrin is released from the gel as a result from proteolysis by adherent cells. Thus, plasmin generated by adherent cells appears to produce only minor decomposition of the surface. When such “postadhesive” gels were treated with SDS to remove loosely bound fibrin fragments, the adhesiveness of fibrin clot was restored.

Since both fibrinogen and plasminogen exert potent effect, we examined the interplay between two antiadhesive systems, non-proteolytic fibrinogen-dependent and proteolytic plasminogen-dependent, operating at the same surface of fibrin clot. When fibrin clots are exposed to fibrino-

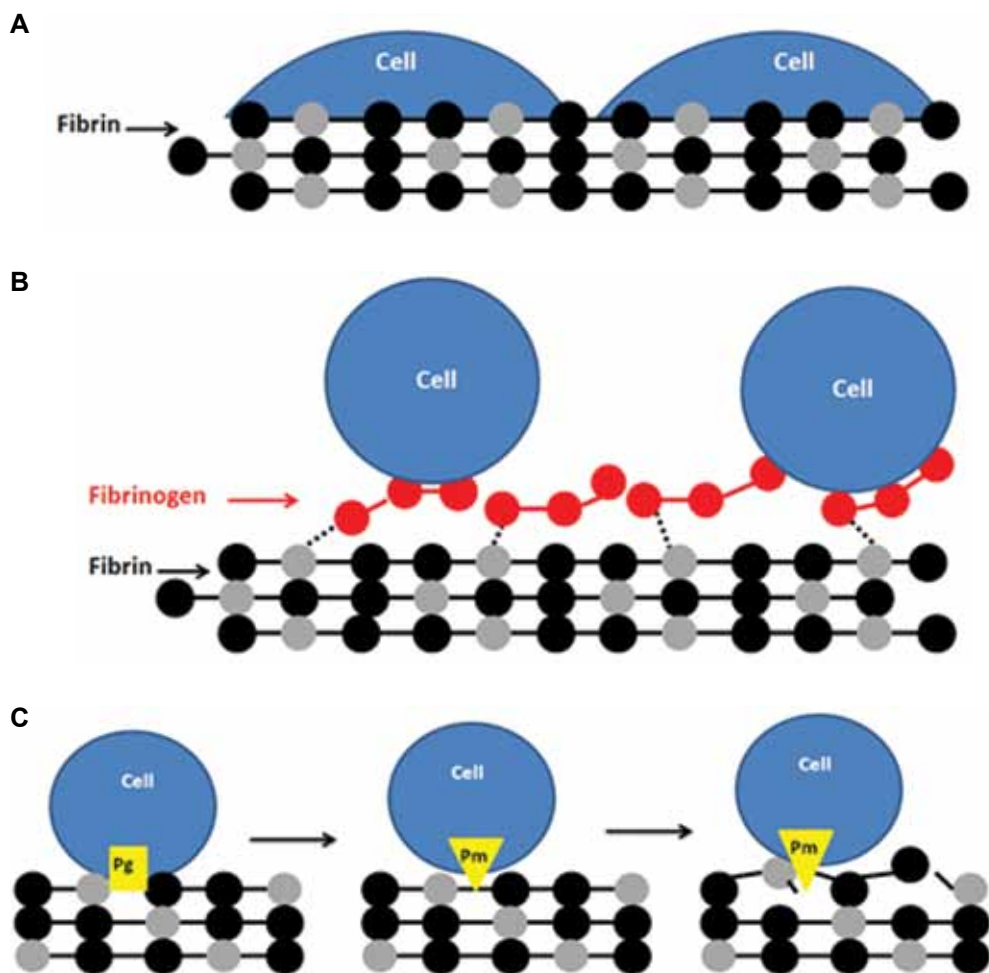


Fig. 12. Model of the mechanisms preventing growth of thrombus in the site of injury. (A, B) Plasma fibrinogen interacts with the surface of fibrin clot, forming a layer consisting of loosely bound molecules. This results in the formation of a “feeble” adhesive substrate. Flowing cells can engage either the solid fibrin matrix followed by spreading and firm adhesion (A), whereas cells that engage loosely bound molecules in the fibrinogen layer slip off, not being able to resist the shearing force of the flow (B). (C) Activation of plasminogen on the surface of fibrin clot by plasminogen activation system results in the generation of plasmin which degrades the superficial fibrin layer. Degraded fibrin molecules are not able to hold cells under flow

gen and plasminogen simultaneously, as it would occur in the circulation, the deposition of fibrinogen on the surface of a clot prevents activation of fibrin-bound plasminogen by transiently adherent cells. The precise mechanism by which the simultaneous adsorption of fibrinogen and plasminogen abolishes activation of plasminogen by cells will require further study. However, the simplest interpretation of the observed phenomenon is that the fibrinogen due to its abundance in the circulation produces a matrix which masks the surface-bound plasminogen and precludes its physical contact with cells.

The above experiments show that two fibrin-binding proteins, plasminogen and fibrinogen, strongly reduce adhesion of leukocytes and platelets to fibrin clots, highlighting a possible role for these plasma proteins in surface-mediated control of thrombus growth and stability. In particular, adsorption of fibrinogen on fibrin clots renders their surfaces non-adhesive, while the conversion of surface-bound plasminogen to plasmin by transiently adherent blood cells results in degradation of a superficial fibrin layer, leading to cell detachment in flow. Although the mechanism whereby these proteins exert their antiadhesive effects—proteolytic and non-proteolytic—seems different, the outcome is the same: the formation of mechanically instable surface that does not allow firm cell attachment (Fig. 12).

The existence of two potent antiadhesive mechanisms, fibrinogen- and plasminogen-dependent, raises a question of their potential contribution to the nonadhesive properties of the fibrin clot surface. Because of the clear superiority of the fibrinogen-dependent system, it is uncertain under which circumstances the plasminogen-dependent system may play a significant role. One of the possibilities is the heterogeneity of the clot surface. Recent studies using a novel technique that allowed the imaging of the thrombi developed in large vessels demonstrated that the surface of clots displayed variable spatial intensities of the platelet-, fibrin- and fibrinogen-specific fluorophores, indicating a non-uniform coverage of clots with fibrinogen [3]. Therefore, plasminogen and fibrinogen may accumulate at different regions of the clot. Another possibility is that the contribution of the two antiadhesive systems may be altered in pathological conditions. Further studies of the distribution of fibrinogen and plasminogen on the surface of clots *in vivo* and in model systems *in vitro* may help to define the localization and roles of the two antiadhesive systems.

The surface-mediated control of thrombus growth and stability is a new concept. Although the fact that the surfaces of stable hemostatic thrombi are covered with fibrin has been long known, a paradox as to why fibrin, a highly adhesive substrate for platelets and leukocytes *in vitro*, does not effectively support adhesion of these cells in circulation has not been addressed. We propose that the reason for the loss of reactivity of

fibrin clots for platelets and leukocytes is the ability of fibrin to bind both fibrinogen and plasminogen resulting in the assembly of a potent anti-adhesive system that guards clots from excessive cell accumulation. This protective mechanism may fulfill a dual purpose. First, it will prevent the accumulation of platelets, thereby halting the overall process of thrombus propagation. Second, it will prevent the recruitment of leukocytes whose premature adhesion with a concurrent release of proteolytic enzymes may compromise the thrombus stability essential for early hemostasis. The efficiency of both fibrinogen- and plasminogen-dependent processes observed *in vitro* in conjunction with supporting evidence from *in vivo* studies suggests their physiological relevance. Thus, surface-mediated control of thrombus growth and stability may represent a previously unrecognized aspect of hemostasis.

References

1. Falati S., Cross P., Merrill-Skoloff G. et al. Real-time *in vivo* imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse // *Nat. Med.* – 2002. – **8**. – P. 1175–1181.
2. Kamocka M. M., Mu J., Chen N. et al. Two-photon intravital imaging of thrombus development // *J. Biomed. Optics.* – 2010. – **15**. – P. 016020-1-016020-7.
3. Cooley B. C. *In vivo* fluorescence imaging of large-vessel thrombosis in mice // *Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol.* – 2011. – **31**. – P. 1351–1356.
4. van Aken P. J., Emeis J. J. Organization of experimentally induced arterial thrombosis in rats: the first six days // *Artery.* – 1982. – **11**. – P. 156–173.
5. van Ryn J., Lorenz M., Merk H. et al. Accumulation of radiolabeled platelets and fibrin on the carotid artery of rabbits after angioplasty: effects of heparin and dipyridamole // *Thromb. Haemost.* – 2003. – **90**. – P. 1179–1186.
6. Groves H. M., Kinlough-Rathbone R. L., Richardson M. et al. Thrombin generation and fibrin formation following injury to rabbit neointima // *Lab. Invest.* – 1982. – **46**. – P. 605–612.
7. McGuinness C. L., Humphries J., Waltham M. et al. Recruitment of labelled monocytes by experimental venous thrombi // *Thromb.Haemost.* – 2001. – **85**. – P. 1018–1024.
8. Lishko V. K., Burke T., Ugarova T. P. Anti-adhesive effect of fibrinogen: A safeguard for thrombus stability // *Blood.* – 2007. – **109**. – P. 1541–1549.
9. Schielen W. J. G., Voskuilen M., Tesser G. I., Nieuwenhuizen W. The sequence A-alpha-(148-160) in fibrin, but not in fibrinogen is accessible to monoclonal antibodies // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – **86**. – P. 8951–8954.
10. Zamarron C., Ginsberg M. H., Plow E. F. Monoclonal antibodies specific for a conformationally altered state of fibrinogen // *Thromb. Haemost.* – 1990. – **64**. – P. 41–46.
11. Ugarova T. P., Budzynski A. Z., Shattil S. J. et al. Conformational changes in fibrinogen elicited by its interaction with platelet membrane glycoprotein GPIIb-IIIa // *J. Biol.Chem.* – 1993. – **268**. – P. 21080–21087.

12. *Lishko V. K., Kudryk B., Yakubenko V. P. et al.* Regulated unmasking of the cryptic binding site for integrin $\alpha_M\beta_2$ in the γ C-domain of fibrinogen // *Biochemistry*. – 2002. – **41**. – P. 12942–12951.
13. *Podolnikova N. P., Yermolenko I. S., Fuhrmann A. et al.* Control of integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ outside-in signaling and platelet adhesion by sensing the physical properties of fibrin(ogen) substrates // *Biochemistry*. – 2010. – **49**. – P. 68–77.
14. *Lisko V. K., Yermolenko I. S., Owaynat H., Ugarova T. P.* Fibrinogen counteracts the antiadhesive effect of fibrin-bound plasminogen by preventing its activation by adherent U937 monocytic cells // *J. Thromb. Haemost.* – 2012. – **10**. – P. 1081–1090.
15. *Yermolenko I. S., Fuhrmann A., Magonov S. N. et al.* Origin of nonadhesive properties of fibrinogen matrices probed by force spectroscopy // *Langmuir*. – 2010. – **26**. – P. 17269–17277.
16. *Yermolenko I. S., Lishko V. K., Ugarova T. P., Magonov S. N.* High-resolution visualization of fibrinogen molecules and fibrin fibers with atomic force microscopy // *Biomacromolecules*. – 2013. – **12**. – P. 370–379.
17. *Yermolenko I. S., Gorkun O. V., Fuhrmann A. et al.* The assembly of nonadhesive fibrinogen matrices depends on the α C regions of the fibrinogen molecule // *J. Biol. Chem.* – 2012. – **287**. – P. 141979–141990.
18. *Sakharov D. V., Rijken D. C.* Superficial accumulation of plasminogen during plasma clot lysis // *Circulation*. – 1995. – **92**. – P. 1883–1890.
19. *Lishko V. K., Yermolenko I. S., Ugarova T. P.* Plasminogen on the surface of fibrin clot prevents adhesion of leukocytes and platelets // *J. Thromb. Haemost.* – 2010. – **8**. – P. 799–807.

MONOCLONAL ANTIBODIES TO STUDY FIBRIN POLYMERIZATION AND THEIR APPLICATION FOR THROMBUS FORMATION THREAT DIAGNOSTICS

E. V. LUGOVSKOY, I. N. KOLESNIKOVA, S. V. KOMISARENKO

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: lougovsk@biochem.kiev.ua*

It was shown by monoclonal antibodies (mAbs) that B β N-region of fibrin desA molecule (B β 1-53) comprises the polymerization site including the peptide bond B β 14-15. This site participates in the second stage of fibrin polymerization – lateral association of protofibrils. In the B β 15-53 fragment was also found the site called “C”, which together with the site “A” participate in the first stage of polymerization - the protofibrils formation. The model of the primary intermolecular interaction of fibrin was designed. It was found by mAb II-4d the site (“c”) in the N-terminal half of γ chain of the fibrin D-region. This site participates in the protofibrils formation and is complement to site “C” as we assume.

We have discovered two neoantigenic determinants. One of these determinants exposes within the coiled-coil fragment B β 126-135 of fibrin as a result of fibrinopeptide A splitting off from fibrinogen by thrombin. The structural rearrangements discovered in this site of the fibrin molecule are necessary for the following protofibrils lateral association. The second neoantigenic determinant is localized in the fragment B β 134-190 of D-dimer formed after plasmin degradation of fibrin stabilized by FXIIIa. We have obtained the fibrin-specific mAb FnI-3C to the first determinant and D-dimer-specific mAb III-3b to the second one.

Three mAbs were obtained against the α C-region of fibrin(ogen) molecule. It has been experimentally shown by one of them that α C-domains is connected with the fibrinopeptides B in fibrinogen and fibrin desA molecules, but removes from the core of the molecules after fibrinopeptides B splitting off by thrombin. Two other mAbs specifically inhibit the fibrin polymerization by blocking two unknown polymerization sites within the α C-region.

The test-systems for the soluble fibrin and D-dimer quantification in human blood plasma were designed on the basis of mAb FnI-3C and III-3b as “catch”-antibodies and mAb II-4d as a “tag”- antibody, respectively. The clinical trials of the test-systems were carried out in Ukraine. It was shown that for the prediction of postoperative thrombotic complications and monitoring the efficiency of antithrombotic therapy the simultaneous quantification of soluble fibrin and D-dimer before the operation and at different time intervals

after the operation is required. Only in this case it is possible to get information about the state of the balance between blood coagulation and fibrinolytic systems, and determine the degree of the threat of thrombosis.

Fibrinogen (Fg) is a protein playing the main role in functioning of blood coagulation system [1]. It has a dimeric structure where two subunits are formed by three polypeptide chains: $A\alpha$, $B\beta$ and γ . The fibrinogen molecule consists of a central E, two peripheral D-regions and two extended α C-regions.

The E-region, consisting of ($A\alpha$ 1-104, $B\beta$ 1-133, γ 1-72)₂, is formed by the N-terminal segments of all six polypeptide chains. The two D-regions, each comprising of $A\alpha$ 105-219, $B\beta$ 134-461 and γ 73-411 in the C part of the molecule, have the globular β C232-461 and γ C170-411 nodules. The extended α C-regions ($A\alpha$ 220-610) consist of an unstructured flexible α C-connector ($A\alpha$ 220-391) and a more structured α C-domain ($A\alpha$ 392-610) [2, 3].

The peripheral D-regions are connected with the central E-region by two long flexible coiled-coil connectors each of which consists of polypeptide fragments $A\alpha$ 48-161, $B\beta$ 79-193, γ 23-135. The N-parts of these fragments include $A\alpha$ 48-104, $B\beta$ 79-133, γ 23-62 and belong to the E-region. The C-parts $A\alpha$ 105-161, $B\beta$ 134-193, γ 63-135 belong to the D-region (Fig. 1).

The splitting off of fibrinopeptides A (FpA) – $A\alpha$ 1-16 from fibrinogen (Fg) by thrombin results in the formation of desA fibrin (Fn) with two exposed polymerization sites called A-knobs [4]. The two A-knobs interact with a-holes in the two D-regions of the other Fn molecules forming protofibrils. The protofibrils associate laterally, giving rise to fibrils and, finally, the three-dimensional fibrin net. At the stage of protofibril and fibril formation thrombin splits off of fibrinopeptides B (FpB) – $B\beta$ 1-14 from Fn desA molecules exposing the B-knobs which are involved in the process of protofibril lateral association interacting with the b-holes in the D-regions of the other molecules [5].

Two steps of fibrin polymerization – protofibrils formation and their lateral association – are carried out by the intermolecular and interprotofibril binding of specific polymerization sites [6, 7]. Polymeric fibrin is stabilized by factor XIIIa [8]. After polymeric fibrin formation plasminogen is activated on fibrin surface by tPA and transformed into plasmin [9, 10]. Plasmin splits polymeric fibrin stabilized by factor XIIIa forming E-fragment and D-dimer.

Monoclonal antibody (mAb) can be obtained against antigenic determinant (epitope), which can coincide or be located closely to the polymerization site of fibrin molecule. Such a mAb presumably inhibits fibrin polymerization by blocking the polymerization site or the neighboring one.

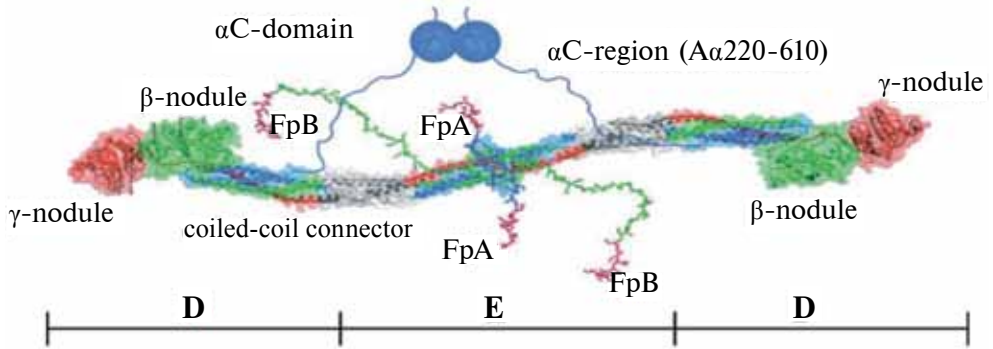


Fig. 1. The model of fibrinogen molecule created with graphics system PyMol on the base of X-ray and NMR analysis of fibrin(ogen) fragments [2]. A α -chains – blue; B β -chains – green; γ -chains – red

MAB can also “recognize” minor alterations in the epitope conformation. That is why mAbs have been used as molecular probes for localization of unknown antigenic determinants and/or polymerization sites [11, 12].

The tactics of our investigations was following:

- obtaining of antigen for mice immunization: native or slightly denaturated fibrin(ogen) molecules or their fragments;
- obtaining of mAbs;
- selection of mAbs and obtaining their Fab-fragments, which both specifically inhibit fibrin polymerization;
- electron microscopy for determination of fibrin polymerization stage, which is inhibited by the mAb and Fab-fragment.
- epitope localization in fibrin(ogen) molecule for mAb – inhibitor;
- synthesis of the peptide, which imitates the amino acid sequence of fibrin molecule in the monAb epitope region;
- testing of the synthetic peptide inhibitory action on fibrin polymerization.

Three types of monoclonal antibodies of different specificity have been obtained against the N-terminal disulphide knots of fibrinogen and fibrin. Their effects on distinct stages of fibrin polymerization have been studied. These antibodies were shown to be directed against various epitopes of the B β 1-53 fragment of the fibrinogen molecule. The mAbs had different effects both on the rate of protofibril lateral aggregation and on the final turbidity of fibrin clots. The mAbs were of three specificities: mAb 2d-2a and its Fab-fragment inhibited the rate of lateral aggregation of protofibrils and decreased the turbidity of the final clot; those from clone B-4C accelerated the polymerization, but did not affect the clot turbidity; and those from clone D-IB did not have any effect on either fibrin polymerization or fi-

nal clot turbidity and served as the negative control. The most interesting results were obtained with mAb 2d-2a, epitope for which was localized in fibrin desA fragment including the peptide bond B β 14-15 [13]. This mAb and its Fab-fragment inhibited the lateral association of fibrin desA protofibrils (Fig. 2) by blocking the site comprising amino acid residues located around the peptide bond B β 14-15. We suggested that N-terminal part of fibrin desA B β -chain concludes one of the active sites involved in protofibril lateral association. Fibrinopeptide B does not need to be split off for functioning of this site. Interestingly that only one mAb molecule can bind to one of two its epitopes in dimeric fibrin desA molecule blocking one peptide bond B β 14-15 and inhibiting 60% of fibrin polymerization. In such a case, thrombin may split off only one fibrinopeptide B from fibrinogen. However, two Fab-fragments of this mAb can bind to both epitopes in fibrin desA, blocking them and inhibiting about 100% of polymerization. This mAb has been used as catch-antibody in our ELISA test-system for fibrinogen quantification in human blood plasma after its dilution in 200 times [14].

D-dimer of human fibrin was also used as antigen to obtain monoclonal antibodies. We have obtained 16 hybridomas producing mAbs of different specificity. MAb III-3b binds D-dimer with $K_d = 1.4 \times 10^{-10}$ M without cross-reaction with fibrinogen and fibrin. The epitope for this mAb is located in fibrin(ogen) fragment B β 134-190 (Fig. 3). The latter site is buried in the coiled-coil structure of fibrin(ogen), but it is exposed as a neoantigenic determinant (NAD) in D-dimer upon plasmin hydrolysis of fibrin [15]. MAb III-3b has been used in our ELISA immunodiagnostic

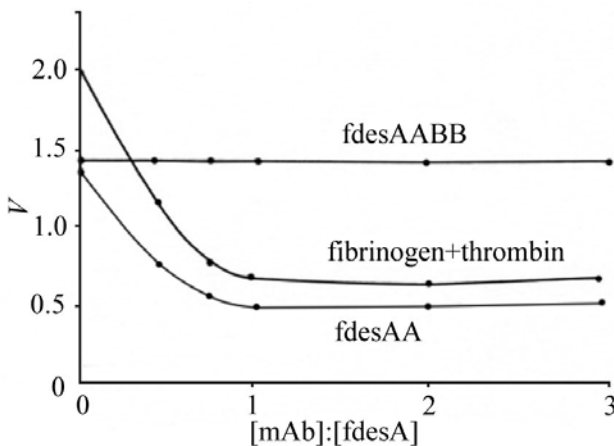


Fig. 2. Dependence of the rate of protofibrils lateral association (V) on the concentration of mAb 2d-2a

test-system as a catch-antibody for quantification of D-dimer in human blood plasma [16].

Only two of these 16 hybridomas produced mAbs of the IgG-class that inhibited fibrin polymerization. MAb II-4d inhibited fibrin polymerization to 100% at a molar ratio mAb : fibrin = 1.0. Fab-fragments of the mAb inhibited fibrin polymerization completely at the same molar ratio (Fig. 4.1). The epitopes for the mAbs studied are situated in the NH₂-terminal part of the γ -chain in fibrin D-domain. Electron microscopy showed that fibrin was in monomeric form in the presence of these mAbs or their Fab-fragments (Fig. 4.2). Thus, these mAbs inhibit the initial step of fibrin polymerization, i.e. protofibril formation. Only one site of protofibril formation located in COOH-terminal half of the D-domain γ -chain is known now named “a” site, which is complementary to the “A” site in the central E-domain of fibrin molecule. Our experiment with immobilized GPRP showed that the “a” site in fibrin D-fragment preserved its binding activity to GPRP when the D-fragment was complexed with mAbs-inhibitors of fibrin polymerization. Thus, these two mAbs inhibit fibrin polymerization not by blocking the sites “a”, but either by blocking another (inconsistent with “a”) unknown specific site of polymerization in D-domain or by steric hindrance of highly organized fibrin polymerization process [17]. MAb II-4d has been used in three our immunodiagnostic test-systems for fibrinogen, soluble fibrin and D-dimer quantification in human blood plasma as the tag-antibody [14, 16, 18]

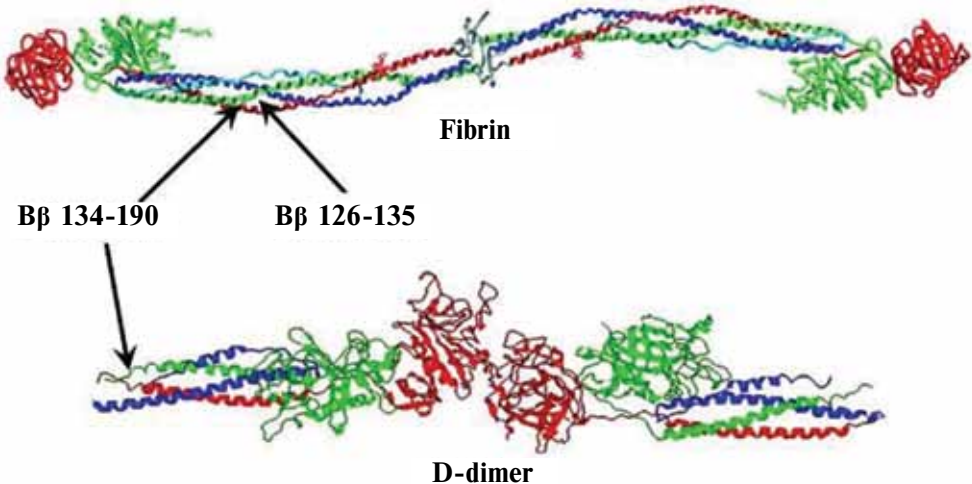


Fig. 3. The scheme of epitopes localization for mAb I-3c and mAb III-3b in fibrin and D-dimer molecules, respectively

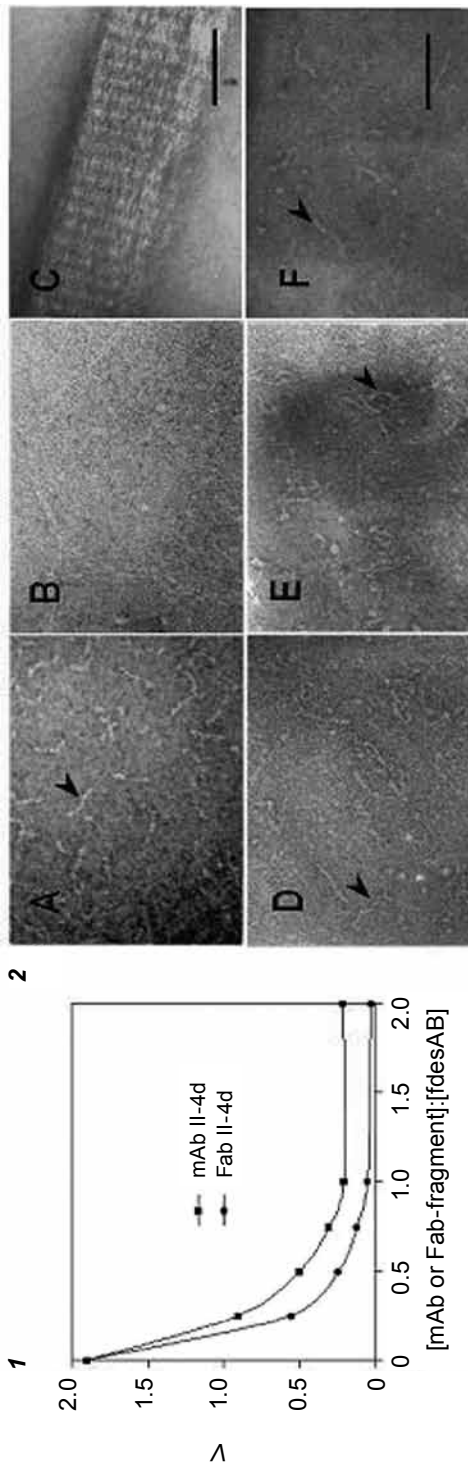


Fig. 4. (1) Dependence of the velocity of fibrin polymerization (V) on the molecular ratio of mAb II-4d and its Fab-fragments to fibrin desAB. (2) Electron microscope images of fibrin desAB polymerizing in the presence (A, B, C) and in the absence (D, E, F) of mAb II-4d after 3, 5 and 7 min, correspondingly. There were no difference between electron microscope images obtained in the presence of Fab-fragments and mAb II-4d

Four mAbs of the IgG1 class to the thrombin-treated N-terminal disulfide knot of fibrin, secreted by various hybridomas, have been selected. Epitopes for two mAbs I-3C and III-10d were located in human fibrin fragment B β 15–26, and epitopes for mAbs I-5G and I-3B were in fragment B β 26–36. Three of these mAbs, I-5G, I-3B and III-10D as well as their Fab-fragments decreased the maximum rate of fibrin desA and desAB polymerization up to 90–95% at a molar ratio of mAb (or Fab-fragment) to fibrin of 1 or 2. The fourth mAb I-3C did not influence on fibrin desAB polymerization and inhibited by 50% the maximum rate of fibrin desA polymerization. These results suggest that these mAb-inhibitors block a longitudinal fibrin polymerization site. As the mAbs retard both fibrin desAB and fibrin desA polymerization, one can conclude that the polymerization site does not coincide with polymerization site ‘B’ (B β 15-17). To verify this suggestion, the polymerization inhibitory activity of synthetic peptides B β SARGHRPLDKKREEA(12–26), B β LDKKREEA(19–26), B β APSLRPAPPPI(26–36), B β APSLRPAPPPISSGGGYRARPA(26–46) and B β GYRARPA(40–46), which imitate the various sequences in the N-terminal region of the fibrin B β -chain, have been investigated. Peptides B β 12–26 and B β 26–46, but not B β 40–46, B β 19–26, and B β 26–36, proved to be specific inhibitors of fibrin polymerization. The IC₅₀ values for B β 12–26 and B β 26–46 were 2.03×10^{-4} and 2.19×10^{-4} M, respectively. Turbidity and electron microscopy data showed that peptides B β 12–26 and B β 26–46 inhibited the fibrin protofibril formation stage of fibrin polymerization. The conclusion was drawn that fibrin fragment B β 12–46, named as the site “C”, took part in fibrin protofibril formation simultaneously with site “A” (A α 17–19) prior to removal of fibrinopeptide B. A model of the intermolecular connection between fragment B β 12–46 of one fibrin desA molecule and the D-domain of another has been constructed (Fig. 5) [7].

While the fibrin protofibril formation mechanism is well-studied, the protofibril lateral association mechanism remains elusive. The initial interaction of fibrin monomers leading to protofibril formation is realized mainly by the pair of complementary centers A:a. An additional site “C” of protofibril formation is localized within the E domain [7]. The protofibril lateral association is realized by the lateral interactions of the D-D dimers from the neighboring protofibrils. The interacting fragments were determined as γ 350-360 and γ 370-380. The interprotofibril D-D dimer interactions lead to formation of so called D-tetramers [19].

However, Kollman et al [20] have discovered antiparallel contacts of fibrinogen coiled-coil fragments in the crystals of human fibrinogen and proposed the possibility of intermolecular coiled-coil interactions during the fibrin protofibril lateral association. We obtained earlier [21] the fibrin-specific mAb FnI-3c, which reacts with fibrin and does not react with fi-

brinogen and D-dimer. The NAD of this mAb formed during fibrinogen to fibrin transformation was localized preliminary within the B β M118-V133 fragment, which is the part of the coiled-coil connector of the fibrin(ogen) molecule. It was shown that mAb I-3c and its Fab-fragment specifically inhibit the stage of fibrin protofibril lateral association (Fig. 6). Thus, we suggested that this region also participates in the process of the fibrin protofibril lateral association [21].

Turbidity analysis and electron microscopy, showed that the synthetic peptide imitating fibrin fragment B β 121-138, but not B β 109-126, also inhibits the step of the fibrin protofibril lateral association. SPR analysis revealed that mAb FnI-3C interacts with the peptide B β 121-138. This mAb also interacts with human, horse, and rabbit fibrins, but not with cow and rat fibrins. Alignment of the amino acid sequences of these fibrins allowed us to identify the residue B β K130 as crucial for the mAb FnI-3C epitope formation and to propose that the epitope in human fibrin is formed by the amino acid residues of the B β 126-135 fragment. With the help of electrophoretic and ELISA parallel analysis we demonstrated that the exposition of the epitope is not the result of the removal of the α C-regions from the bulk of the molecule during the fibrinogen-fibrin transformation. SPR analysis reveals that the exposition takes place as the result of FpA splitting in a monomeric fibrin [22]. The analysis of the mutations in the of coiled-coil connector of the fibrin molecule corresponding to B β 111-141, which impair fibrin polymerization, demonstrates that these mutations alter the structure of this fragment, but not its surface. Contrariwise, the mutations in the fragment B β 158-170 of the coiled-coil connector alter the surface. The comparative conformational analysis of the fibrinogen and fibrin molecules suggests that the fragment of the coiled-coil connector corresponding to B β 126-135 is more flexible in fibrin. The mobility of the fragments of the molecule around this fragment is higher in fibrin than in fibrinogen. Thus, we suppose that FpA splitting by thrombin leads to structural rearrangements in the human fibrin fragment of the coiled-coil connector, which includes polypeptide fragments A α 91-103, B β 126-135 and γ 69-77. These structural rearrangements provide fibrin protofibrils with a capability to associate laterally forming fibrils. The other fragment of the coiled-coil connector including B β 158-170 may act as one of interprotofibril contact sites (Fig. 7).

MAb I-3C has been used as a “catch”-one in double-sandwich ELISA for soluble fibrin quantification in human blood plasma [18].

Monoclonal antibodies FnII-2M [23], I-5B and I-6B [24] to the α C-region of the human fibrin(ogen) have been obtained. The epitope for mAbs FnII-2M, I-5B are localized within the fibrin fragment A α 240-491 and for mAb I-6B – within A α 509-602 fragment. By virtue of the monAb

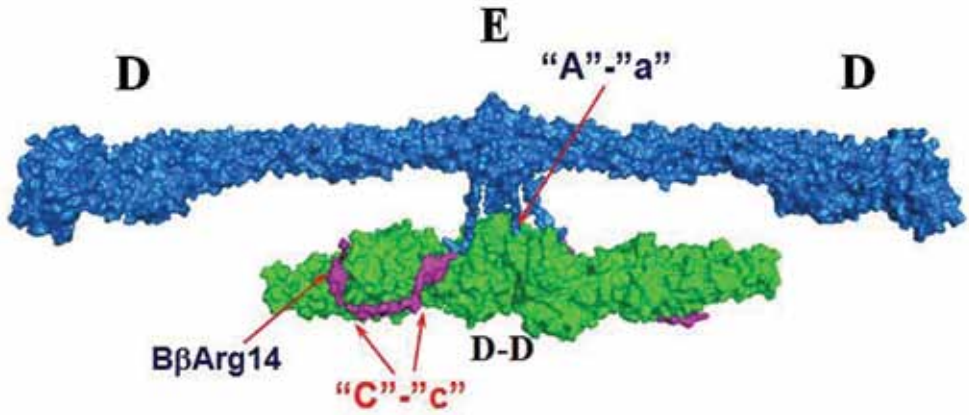


Fig. 5. The model of the intermolecular connection between the D-domain of one fibrin desAA molecule (blue) and B β 12–46 (magenta) of another. The model was prepared with PYMOL [17] on the basis of the X-ray analysis data of chicken fibrinogen [18] and human D-dimer bound with synthetic peptide GPRP [19]

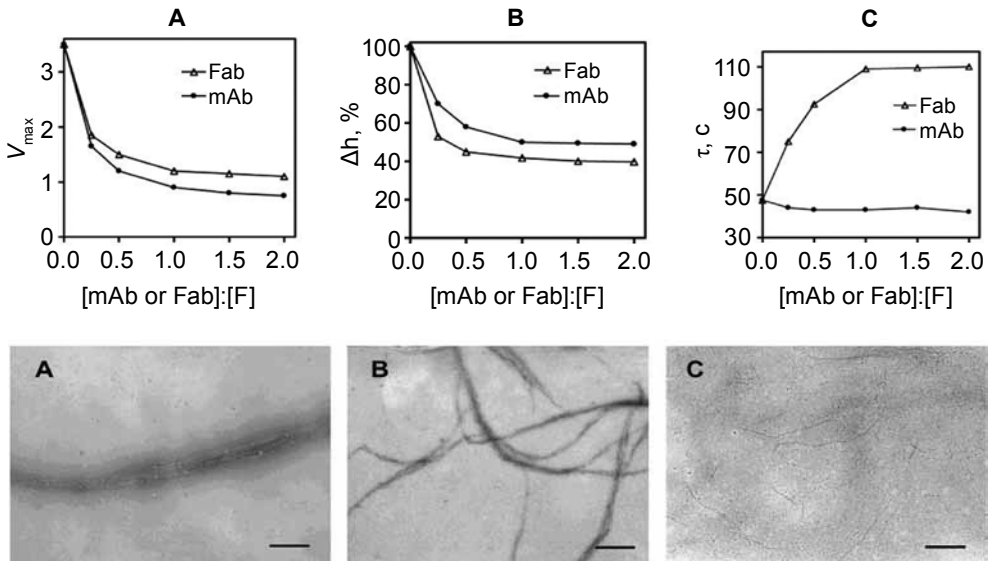


Fig. 6. The influence of mAb FnI-3C and its Fab-fragment on polymerization of fibrin produced in fibrinogen+thrombin reaction in turbidity analysis (1). The dependence of the maximum rate of the fibrin polymerization V_{max} (A), final turbidity of fibrin clots Δh (B) and the lag time τ (C) on molar ratio of mAb FnI-3C or its Fab-fragment to fibrin. (2) Electron micrographs of negatively contrasted structures formed during polymerization of fibrin produced in fibrinogen+thrombin reaction in 135 s from start of the process: in the absence mAb FnI-3C or Fab-fragment (A); in the presence of mAb FnI-3C (B) or its Fab-fragment (C). The bars represent 200 nm

FnII-2M, which react only with fibrin desAB and does not react with Fg and fibrin desA it was found that α C-regions are connected with FpB in the fibrinogen, monomer and polymer fibrin desA. However, the α C-regions move away from the core of the fibrin desA molecules after FpB cleavage by thrombin from fibrin desA in protofibrils, resulting in enhancing lateral association of protofibrils. It was been confirmed by ELISA and method of surface plasmon resonance (SPR) that monAb FnII-2M

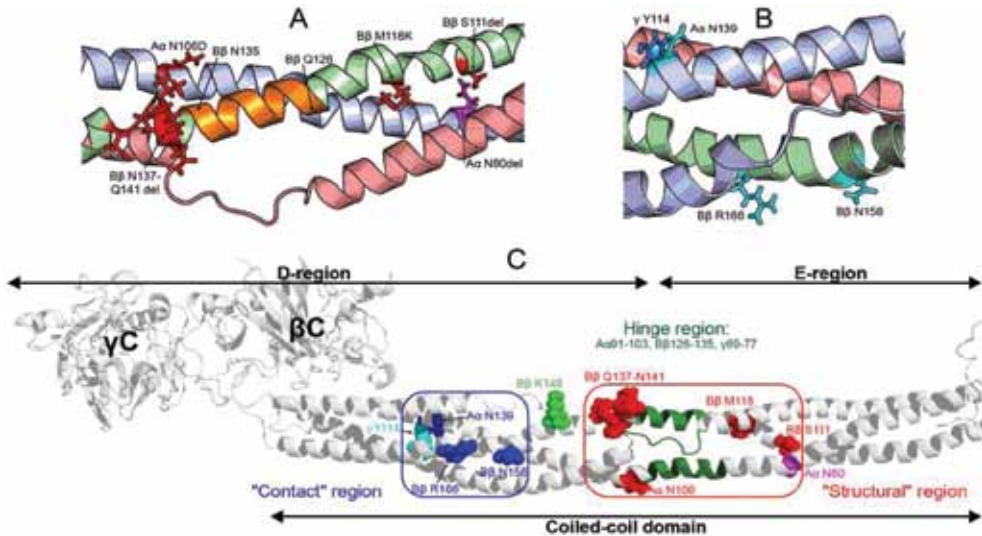


Fig. 7. (A) The localization of five human fibrinogen mutations in B β 111-141 and in the corresponding α -chain fragments that alter the structure of this coiled-coil fragment in mutant fibrinogens: Kyoto IV (B β S111del), Lyon (B β M118K), Epsom (B β N137-E141 del) and Plzen (A α N106D) are shown as red sticks and Caracas VI (A α N80del) is shown as magenta sticks. The suggested epitope for mAb FnI-3c (B β 126-135) is in orange. (B) The localization of the amino acid residues where the structural alterations take place in the four mutant fibrinogens: Lima (A α R141S), Niigata (B β N160S), Longmont (B β R166C) and San Diego II (γ Y114H) are shown as sticks. The novel sites A α N139 and B β N158 of oligosaccharide attachment in fibrinogens Lima and Niigata are blue. The amino acid residue B β 166, where an individual cysteine from the medium attaches to B β 166C in fibrinogen Longmont (B β R166C), is blue. In fibrinogen San Diego II the buried hydrophobic Y114 (cyan) is replaced by H. (C) The location of the SLA/NAD "structural" site corresponding to B β 111-141, the "contact" site corresponding to B β 158-170, and the "hinge region" (A α 91-103, B β 126-135 and γ 69-77) in the human fibrin(ogen) molecule (PDB ID: 3GHG). The "structural" site and the hinge region are on the border between the D- and E- parts of the coiled-coil domain. The "contact" site is in the C- terminal part of the coiled-coil connector on the lateral side of the D-region of the molecule

does not react with fibrinogen, monomeric and polymeric fibrin desA, but react with fibrin desAB. Thus, accessibility of this monAb to its epitope exists only in fibrin desAB. These results are direct experimental evidence that α C-regions (A α 220-610) are bound FpB in fibrinogen and fibrin desA molecules, but move away from the core of the molecule only after removal of fibrinopeptides B (FpB) by thrombin. These data and the results of the other authors let us to design the three-dimensional structural computer models reflecting of α C-regions spatial orientation in fibrinogen, fibrin desA and fibrin desAB molecules (Fig. 8) [23].

It was investigated that mAbs I-5B and I-6B decreased the maximum rate of fibrin desAB polymerization up to 90% and 76.2%, respectively, at their equimolar ratio to fibrin. These results suggest that these mAbs-inhibitors block the sites into α C-region, which take part in protein-protein interactions during the fibrin polymerization. The mAbs I-5B and I-6B may be used as tag-antibodies together with fibrin-specific “catch”-antibodies I-3C for quantification of the earliest forms of soluble fibrin in human blood plasma with the aim of early diagnostics of thrombophilia.

Soluble fibrin and D-dimer are the most specific markers of activation of the blood coagulation cascade and the threat of thrombosis. We have designed three immunoassay test-systems for D-dimer, soluble fibrin and fibrinogen quantification in human blood plasma on the basis of D-dimer-specific, fibrin-specific and fibrinogen-specific monoclonal antibodies. The fourth test-systems was designed for simultaneous quantification of these molecular markers (Fig. 9). The clinical trials of the test systems were carried out in Ukraine. The high informativity of soluble fibrin quantification as a prognostic indicator of the threat of thrombosis at hip replacement (Fig. 10) and abdominal aorta (Fig. 11) was shown. Independent D-dimer quantification is uninformative. For the prediction of postoperative throm-

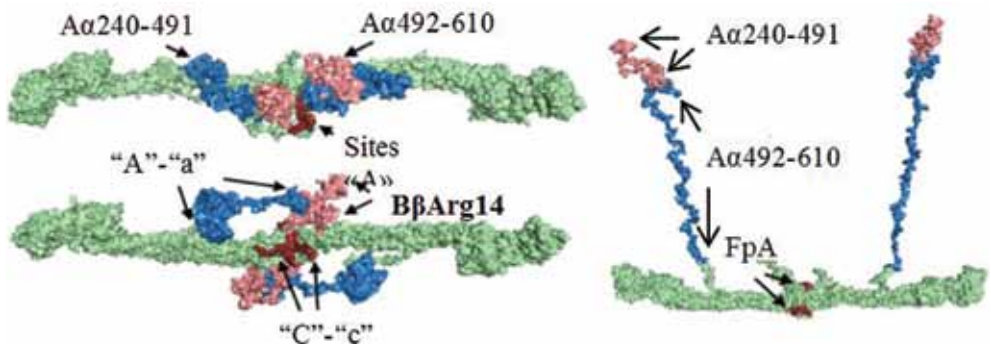


Fig. 8. The models of fibrinogen, fibrin desA and fibrin desAB were done with PyMOL and Modeller9v10

botic complications and monitoring the efficiency of antithrombotic therapy the simultaneous quantification of soluble fibrin and D-dimer before the operation and at different time intervals after the operation is required. Only in this case it is possible to get information about the state of the balance between blood coagulation and fibrinolytic systems, and determine the degree of the threat of thrombosis.

Conclusion

A hundred of mAbs against neoantigenic determinants of fibrinogen, fibrin and their fragments were obtained. In this review we focused on 14 of them, that were used to obtain the new fundamental scientific information or to develop immunodiagnostic test-systems, which have strategic importance for diagnostics of the threat of thrombus formation.

The arrows at the Fig. 12 point at the sites of fibrinogen and fibrin molecules, the mAbs are directed to. Thus, mAb 2d-2a was obtained against the epitope, which consists of amino acid residues located around the peptide bond B β 14-15 cleaved by thrombin. This MAb reacted with fibrinogen and fibrin desA but doesn't with fibrin desAB. These molecules keep the fibrinopeptides B uncleaved. Using 2d-2a mAb we showed for the first time the existence of the site of fibrin protofibrils lateral association within the B β N-domain. This site functions before fibrinopeptides B cleavage off. This work was continued and 4 other mAbs against B β N-



Fig. 9. The immunoassay test-systems for D-dimer, soluble fibrin and fibrinogen and its simultaneous quantification in human blood plasma designed by Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine and LLC “Diaproph”

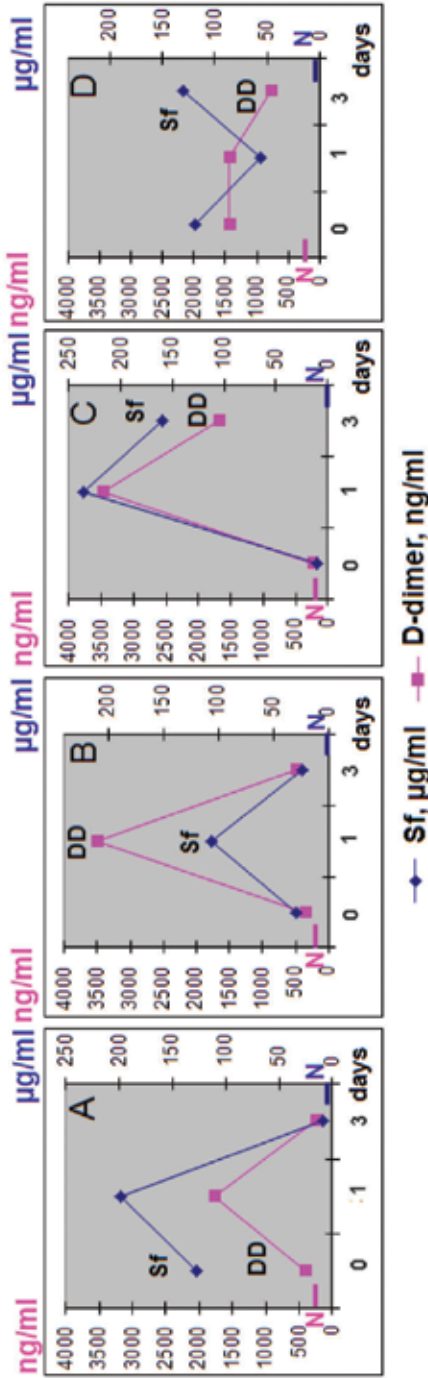


Fig. 10. These figures show the typical combinations of the soluble fibrin (Sf) and D-dimer (DD) concentrations during aneurism of abdominal aorta before the operation, immediately after the operation and on the third day after the operation. Normal (B, C) or increased (A, D) concentrations of Sf and D-dimer were observed before the operation. After the operation in three cases (A, B, C) the significant increase of both markers was observed. On the third day after the operations in two of these cases (A, B) we can see the decrease of these concentrations to normal level. In the case (C) the concentrations of these markers also decreased, but remained above normal level, that required a further control. In the cases (A, B, C) there is a dynamic balance between blood clotting and fibrinolytic systems. It is illustrated by correlated concentration increase and decrease of both markers. In the case D: at once after the operation the concentration of Sf tended to decrease, and the concentration of D-dimer remained at the same level. But on the third day after the operation a steep increase of Sf and the decrease of D-dimer concentrations were observed. This suggests the disturbance of the balance between blood clotting and fibrinolytic systems and the high threat of thrombus formation

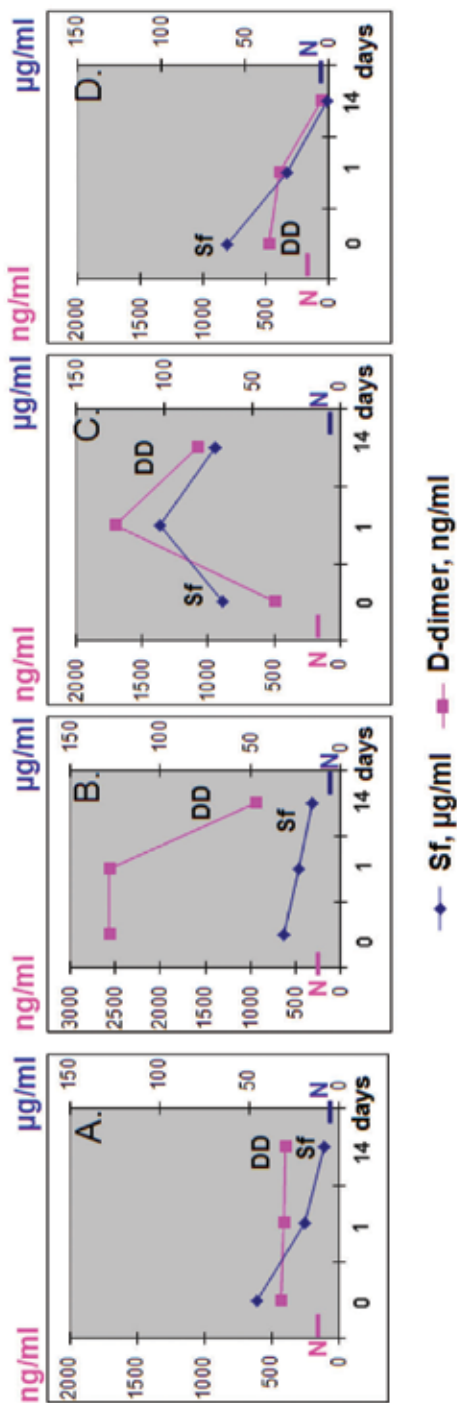


Fig. 11. These figures show the typical combinations of the soluble fibrin (Sf) and D-dimer (DD) concentrations during deep vein thrombosis before the operation, immediately after the operation and on the 14 day after the operation. The main feature of this disease is high concentrations of both markers before treatment that indicates the high degree of activation of blood clotting and fibrinolytic systems. This suggests that during this pathology the activation of blood clotting system as a rule leads to the activation of fibrinolytic system. The dynamics of the concentration changes of these markers are usually correlated: we can see simultaneous increase (C) or decrease (A, B, D) of the concentrations of both markers during treatment. In the case (C) the correlated changes of the concentrations of these markers also takes place, but the high concentrations of these markers on the 14 day after operation testify about necessity of further control

domain (B β 1-64) were obtained. Two of them were directed to site B β 15-25, and others to B β 26-36. Using these mAbs we discovered that there is not only the site of the protofibrils lateral association in the region of B β N-domain, but also the site, which takes a part in the first stage of fibrin polymerization – protofibrils formation.

MAB III-3b obtained in this work reacts only with D-dimer, but doesn't with fibrinogen and fibrin. By virtue of this mAb test-system for quantification of D-dimer in human blood plasma was developed to diagnose the hemostasis disorders. Other MAB II-4d allowed us to locate the fibrin polymerization site in the NH₂-terminal part of γ -chain of D-region, which does not coincide with the polymerization site "a". MAB II-4d, which reacts with fibrinogen, soluble fibrin and D-dimer, has been used for the design of three immunodiagnostic test-systems for quantification of these molecular markers of thrombophilia in human blood plasma as the tag-antibody.

By virtue of fibrin-specific mAb FnI-3C we discovered an neoantigenic determinant in fibrin molecule, which is exposed after the conversion of fibrinogen into fibrin. This determinant is located in B β 126-135 and coincides with the epitope for mAb I-3C and with the site, which plays functional role in the fibrin protofibrils lateral association. Using this mAb the functional role of coiled-coil connector of fibrin molecule in the fibrin polymerization was showed for the first time. MAB I-3C reacts only

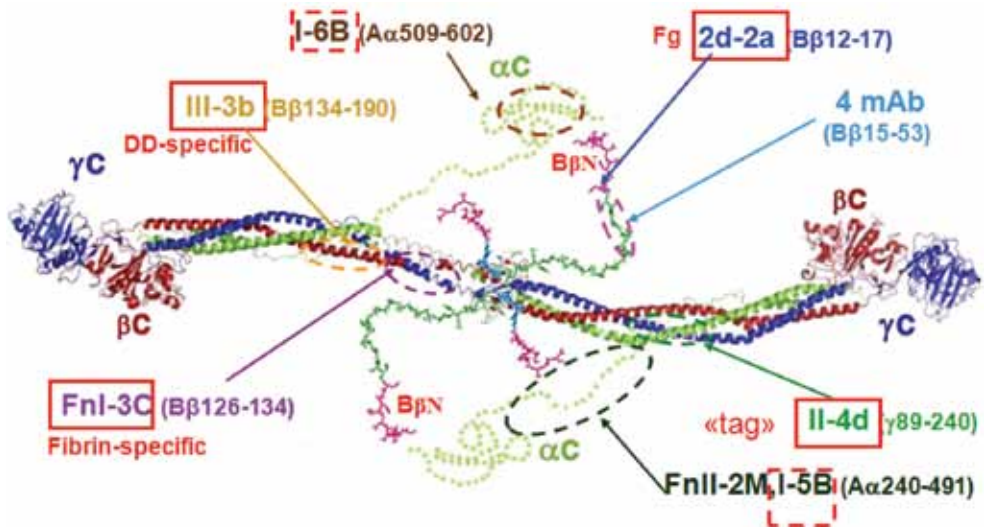


Fig. 12. The model of fibrinogen molecule, where are shown the mAbs and localization of epitopes for them

with fibrin, does not react with fibrinogen and D-dimer and can be used in double-sandwich ELISA test-system for soluble fibrin quantification in human blood plasma as a “catch”-mAb for diagnostics of the threat of thrombus formation.

Finally, three mAbs to α C-connector of fibrinogen were produced. MAbs II-2M of IgM class allowed us to confirm binding of α C-connector to fibrinopeptides B in fibrinogen and fibrin desA molecules. The presence of two polymerization sites in C-terminal parts of α C-connector was also shown using other mAbs I-5B and I-6B.

Thus monoclonal antibodies proved to be very useful for discovering unknown antigenic determinants and polymerization sites within the fibrin molecule; for the study of the three-dimensional structure of the fibrin molecule and for designing of test-systems to diagnose the threat of the intravascular thrombus formation.

References

1. *Blomback B.* Fibrinogen and fibrin proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis // *Thromb. Res.* – 1996. – **83**. – P. 1–75.
2. *Yang Z., Kollman J. K., Pandi L., Doolittle R. F.* Crystal structure of native chicken fibrinogen at 2.7 Å resolution // *Biochemistry.* – 2001. – **40**. – P. 12515–12523.
3. *Burton R. A., Tsurupa G., Hantgan R. R.* NMR solution structure, stability, and interaction of the recombinant bovine fibrinogen α C-domain fragment // *Biochemistry.* – 2007. – **46**. – P. 8550–8560.
4. *Laudano A. P., Doolittle R. F.* Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1978. – **75**. – P. 3085–3089.
5. *Weisel J. W.* Fibrin assembly. Lateral aggregation and the role of the two pairs of fibrinopeptides // *Biophys. J.* – 1986. – **50**. – P. 1079–1093.
6. *Moskowitz K. A., Budzynski.* The (DD)E complex is maintained by a composite fibrin polymerization site // *Biochemistry.* – 1994. – **33**. – P. 12937–44.
7. *Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Kapustianenko L. G. et al.* Functional role of Bbeta-chain N-terminal fragment in the fibrinpolymerization process // *FEBS J.* – 2007. – **274**. – P. 4540–4549.
8. *Lorand L.* Factor XIII: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. – **936**. – P. 291–4511.
9. *Medved L., Nieuwenhuizen W.* Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin // *Thromb. Haemost.* – 2003. – **89**. – P. 409–419.
10. *Gaffney P. J.* Fibrin degradation products. A review of structures found in vitro and in vivo // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. – **936**. – P. 594–610.
11. *Komisarenko S. V.* Antigenic determinants of proteins and peptides. In: Voelter W., Bayer E., Ovchinnikov Y., Ivanov V., editors. *Chemistry of peptides and proteins.* Berlin: Walter de Gruyter; 1986. – **3**. – P. 235–47.

12. *Lugovskoi E. V., Komisarenko S. V.* The use of monoclonal antibodies for studying the fibrin polymerization // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2000. – **26**, N 12. – P. 791–798.
13. *Lugovskoi E. V., Makogonenko E. M., Chudnovets V. S. et al.* The study of fibrin polymerization with monoclonal antibodies // *Biomed. Sci.* – 1991. – **2**. – P. 249–256.
14. *Патент № 70456* Україна, МПК А61К39/44 “Тест-система імуноферментна для кількісного визначення фібриногену в плазмі крові людини”. Комісаренко С. В., Луговської Е. В., Колеснікова І. М., Співак М. Я., Гриценко П. Г., Ганова Л. О., Луговська Н. Е., Литвинова Л. М., Ляшко К. Д., Костюченко О. П., Позняк Т. А., Гоголінська Г. К., Ковтонюк Г. В., Терещенко М. І. Заявка від 07.12.2011; опубл. 11.06.2012, бюл. № 11.
15. *Lugovskoy E. V., Kolesnikova I. N., Gritsenko P. G. et al.* A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrin // *Thromb. Res.* – 2002. – **107**, N 3–4. – P. 151–156.
16. *Патент № 69284* Україна, МПК А61К39/44. “Тест-система імуноферментна для кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини”. Комісаренко С. В., Луговської Е. В., Колеснікова І. М., Співак М. Я., Гриценко П. Г., Ганова Л. О., Луговська Н. Е., Литвинова Л. М., Ляшко К. Д., Костюченко О. П., Позняк Т. А., Гоголінська Г. К., Ковтонюк Г. В., Терещенко М. І. Заявка від 05.10.11; опубл. 25.04.2012, бюл. № 8.
17. *Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Kolesnikova I. N. et al.* Two monoclonal antibodies to D-dimer - specific inhibitors of fibrin polymerization // *Thromb. Res.* – 2004. – **113**, N 3–4. – P. 251–259.
18. *Патент № 69283* Україна, МПК А61К39/44. “Тест-система імуноферментна для кількісного визначення розчинного фібрину в плазмі крові людини”. Комісаренко С. В., Луговської Е. В., Колеснікова І. М., Співак М. Я., Гриценко П. Г., Ганова Л. О., Луговська Н. Е., Литвинова Л. М., Ляшко К. Д., Костюченко О. П., Позняк Т. А., Гоголінська Г. К., Ковтонюк Г. В., Терещенко М. І. Заявл. 05.10.11; опубл. 25.04.2012, Бюл. № 8.
19. *Yang Z., Mochalkin I., Doolittle R. F.* A model of fibrin formation based on crystal structures of fibrinogen and fibrin fragments complexed with synthetic peptides // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**. – P. 14156–14161.
20. *Kollman J. M., Pandi L., Sawaya M. R. et al.* Crystal structure of human fibrinogen // *Biochemistry.* – 2009. – **48**, N 18. – P. 3877–3886.
21. *Lugovskoi E. V., Gritsenko P. G., Kolesnikova I. N. et al.* // A neoantigenic determinant in coiled coil region of human fibrin β -chain // *Thromb. Res.* – 2009. – **123**, N 5. – P. 765–770.
22. *Урвант Л. П., Макогоненко Є. М., Березницький Г. К. та ін.* Відщеплення фібрино-пептиду А викликає структурні перебудови в 118-134 ділянці молекули фібрин(оген)у // *ДАН України.* – 2012. – № 7. – С. 170–175.

23. Позняк Т. А., Колеснікова І. М., Макогоненко Є. М. та ін. Зміни просторової орієнтації α C-регіонів в молекулі фібриногену під час його трансформації у полімерний фібрину // Доп. НАН України. – 2012. – № 5. – С. 163–169.
24. Pozniak T. A., Kolesnikova I. N., Pydiura M. O. et al. Monoclonal antibodies to α C-regions of fibrin(ogen) // 38th FEBS Congress «Mechanisms in biology», Saint-Petersburg, Russia. – July 6-11, 2013. Abstract.

NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS: SPECIFIC ANTIBODIES AND FUNCTIONS IN HUMORAL IMMUNITY

M. V. SKOK

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: skok@biochem.kiev.ua*

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are ligand-gated ion channels initially discovered in muscles and neurons and further found in many non-excitabile cells. The present review summarizes the results of studies performed in the Department of Molecular Immunology during the last decade and concerning the structure and functions of nAChRs in B lymphocytes and in mitochondria, as well as the role of nAChR-specific antibodies in the development of neurodegenerative disorders like Alzheimer disease.

Acetylcholine (ACh) is an evolutionary ancient mediator, which, in addition to its functions as a neurotransmitter, regulates vital cellular processes like proliferation, survival, adhesion and motility. Consequently, receptors to ACh of both nicotinic and muscarinic type initially studied in excitable nerve and muscle cells, are now being found in numerous animal tissues, [1–3], and their prototypes have been recently reported in bacteria [4].

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are ligand-gated ion channels discovered in the neuromuscular junctions and fish electric organs and further found in the central and autonomic nervous system, as well as in many non-excitabile cells [5]. Structurally, they are either homo- or heteropentamers composed of various combinations of structurally homologous subunits. Muscular receptors are composed of $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta(\epsilon)$ subunits and are similar in all parts of the body. Neuronal type nAChRs, which are also expressed in non-excitabile cells, are much more heterogeneous: they consist of $\alpha 2$ - $\alpha 10$ and $\beta 2$ - $\beta 4$ subunits combined either as homomers ($\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$) or heteromers ($\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3(\alpha 5)\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, etc; reviewed in [6]). Homomeric $\alpha 7$ nAChRs are considered to be the most evolutionary ancient; they are found in both neurons and non-excitabile cells to control the cell viability [7]; motility [8], as well as angiogenesis [9] and inflammation [10].

The nAChRs were considered related to immune processes when it was found that muscular dystrophy *Myasthenia gravis* can be caused by autoantibodies against muscular nicotinic receptor [11]. Further, the antibodies specific to different nAChR epitopes were generated artificially as the tools to study the subunit composition and functions of nicotinic

receptors expressed in various animal tissues. In particular, muscular type nAChRs were found in the thymus and were considered as the possible immunogens stimulating autoantibody production upon autoimmune myasthenia [12]. In parallel, nicotinic receptors in immune cells attracted attention as potential targets of nicotine causing immunosuppressive effects on both the cellular and humoral immunity in smokers [13]. However, the main efforts were directed to study the expression and role of nAChRs in T lymphocytes, whereas those expressed in B lymphocytes were obviously underestimated. The studies performed in the Department of Molecular Immunology, Palladin Institute of Biochemistry, during the last decade were aimed to fill this gap by investigating the subunit composition, role and mechanisms of functioning of nAChRs expressed in B lymphocytes.

Generation of antibodies against nAChR subunits

The first step to achieve this goal was creating the instruments capable to target specific nAChR subtypes in B lymphocytes. For this purpose, we generated a panel of both polyclonal and monoclonal antibodies against extracellular epitopes of $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ and $\beta 4$ nAChR subunits. The antibodies were directed against synthetic peptides corresponding to the fragments of alpha ($\alpha 3(181-192)$, $\alpha 4(181-192)$, $\alpha 5(180-191)$, $\alpha 7(179-190)$) or beta ($\beta 2(190-200)$, $\beta 4(190-200)$) subunits either participating directly or located closely to the acetylcholine-binding site [6]. The peptides were synthesized in Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece (the group of Prof. S. Tzartos) and in Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation (Prof. V. Tsetlin). Since the peptides were quite different in amino acid composition, the resulting antibodies were assumed to distinguish between homologous subunits and to selectively influence the functions of certain nAChR subtypes. The specificity and functional properties of these antibodies were tested in the established cell lines and in the neurons of several autonomic ganglia expressing corresponding nAChRs by means of immunocytochemistry, immunoenzyme techniques like Western blots and Cell ELISA, fluorescent flow cytometry and electrophysiology approaches to study both acetylcholine-induced membrane currents and excitatory post-synaptic potentials (EPSP) [14–16]. It was demonstrated that the antibodies were both subunit-specific and functionally potent: they blocked membrane currents induced by externally applied acetylcholine [14], as well as electric potentials stimulated through excitation of nerve endings [15]. These studies were performed in collaboration with the laboratory of Prof. V. Skok in Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv. One of these antibodies (mAb 1D6, $\alpha 3(181-192)$ -specific) was used to explore the structure of corresponding epitope within the native nAChR molecule. By means of NMR it was shown that mAb 1D6,

which effectively bound native $\alpha 3$ -containing nAChRs in flow cytometry, stabilized $\alpha 3(181-192)$ peptide in an extended conformation suggesting its similar structure within the whole receptor molecule [17]. This work was performed in collaboration with Dr. M. Marraud from Ecole Polytechniques, Nancy, France. Antibody against $\alpha 9(11-23)$ fragment was obtained later and was tested immediately in B lymphocytes [18].

Structure and functions of nAChRs in B lymphocytes

Having proved the specificity of instruments (antibodies), we used them to screen the nAChRs expressed on the surface of normal mouse B lymphocytes and of several mouse and human cell lines of B lymphocyte origin. It was found that, in contrast to autonomic ganglia, which expressed mainly $\alpha 3(\alpha 5)\beta 4$ and $\alpha 7$ nAChRs, B lymphocytes expressed $\alpha 4(\alpha 5)\beta 2$, $\alpha 7$ - and $\alpha 9$ -containing nAChR subtypes [18]. Their relative quantities were changed along with the B lymphocyte maturation: the immature newly generated B lymphocytes within the bone marrow expressed mainly $\alpha 4\beta 2$ nAChRs, while the mature B lymphocytes in the periphery were mainly $\alpha 7$ -positive [19]. $\alpha 9$ subunit was much less numerous, but its expression increased in the lymphocytes of $\alpha 7$ -/- mice indicating that it could compensate the absence of $\alpha 7$ subunit (this experiment was performed in collaboration with Prof. S. Grando from University of California, Irvine, USA) [18]. In addition, long-term exposure to nicotine resulted in the increase of surface nAChRs of both $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ subtypes, similarly to neuronal nAChRs in the brain, which were shown to be up-regulated in smokers or experimental animals exposed to nicotine [20]. The relative density of nAChR subtypes was different in mice of two strains, C57Bl/6 and BALB/C, indicating that the expression levels of different nAChR subunits were genetically determined [18]. The binding of subunit-specific antibodies was verified and confirmed by the binding of nAChR-specific radioligands, epibatidine and α -bungarotoxin. Epibatidine binds heteromeric, mainly $\alpha 4\beta 2$ nAChRs, while α -bungarotoxin is specific for $\alpha 7$ -containing nAChRs. We found that B lymphocyte-derived X63-Ag-8 myeloma cells expressed on average 10170 ± 1100 [^3H]-Epibatidine (total) and 6730 ± 370 [^{125}I]- α -Bungarotoxin (surface) binding sites per cell, thus reflecting the presence of both homomeric and heteromeric nicotinic receptors [21]. Normal mouse B lymphocytes contained 12200 ± 3200 of epibatidine-binding sites and 3130 ± 750 of α -Bungarotoxin-binding sites per cell [22].

The density of nAChRs on the surface of B lymphocytes increased not only upon their maturation, but also upon activation, both *in vitro* with anti-CD40 antibody and *in vivo* upon immunization with a protein antigen [23]. This data indicated that the nAChRs might be important for regulating B lymphocyte functions. We addressed this question by studying

the effects of specific nAChR ligands on B lymphocyte proliferation and antibody production.

The first experiments were performed in mouse B lymphocyte-derived hybridoma cells [21]. It was found that nicotine stimulated hybridoma cell proliferation but decreased antibody production. In contrast, $\alpha 7$ -specific snake toxins (α -cobratoxin and “weak” toxin) inhibited cell proliferation but increased antibody production. The snake toxins for these studies were obtained and provided to us by the group of Prof. V. Tsetlin.

To study the role of nAChRs in normal B lymphocytes we employed several experimental approaches including the use of knockout mice lacking $\alpha 4$, $\alpha 7$ or $\beta 2$ nAChR subunits, as well as pharmacological instruments specific for different nAChR subtypes. These experiments were performed in collaboration with the laboratory of Prof. Jean-Pierre Changeux at Pasteur Institute in Paris.

It was found that mice lacking nAChR $\alpha 4$, $\beta 2$ or $\alpha 7$ subunits had less IgG in the blood and IgG-producing cells in the spleen, but showed stronger immune response to both protein antigen *in vivo* and CD40-specific antibody *in vitro* than the wild-type mice. These results indicated that signalling through nicotinic receptors affected both the pre-immune state and activation of B lymphocytes in the immune response, possibly *via* CD40-dependent pathway [22].

To further address this question and to exclude a possible contribution of neuronal regulation to the development of immune cells, we created chimera mice, which lacked certain nAChR subunits (subtypes) in a fraction of immune cell precursors only and compared the propagation of either the wild-type or nAChR-deficient B lymphocytes in irradiated hosts [19]. It was found that bone marrow B lymphocytes lacking either $\beta 2$ or $\alpha 7$ nAChR subunits propagated much less efficiently than the wild-type cells bearing corresponding nAChR subtypes. Similar dependence was found for T lymphocytes developing within the thymus. In contrast, the propagation of both B and T lymphocytes in the spleen was dependent on the presence of $\alpha 7$ subunit only; moreover, the effect of the nAChR subunit presence or absence was observed only when mice consumed nicotine with the drinking water. These data confirmed our previously made observation on the differential expression of the two nAChR subtypes along with the B lymphocyte activation and on the pro-proliferative role of nicotine. They also indicated that the endogenous ligand for B lymphocyte-expressed nAChRs was present in the bone marrow and thymus, but not in the spleen. These experiments were performed in collaboration with Drs. R. Grailhe and F. Agenes from Pasteur Institute in Paris.

The observed effect of the nAChR subtype presence on the T lymphocyte development suggested a general role of cholinergic regulation

in hematopoiesis. To study this question in more details, we compared the numbers of different blood cells and their precursors within the bone marrow and spleen of either the wild-type mice or those lacking $\alpha 7$ or $\beta 2$ nAChR subunits. It was found that either the absence of $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors in knockout mice or their desensitization in mice chronically treated with nicotine decreased the number of myeloid and erythroid progenitors and junior cells. In contrast, the absence of $\beta 2$ -containing receptors favored myelocyte generation and erythroid cell maturation. Both erythroid and myeloid progenitor cells bound more $\alpha 4$ -specific antibody than their mature forms, while the binding of α -cobratoxin and $\alpha 7$ -specific antibody was also high in mature cells. It was concluded that the development of both myeloid and erythroid cell lineages is regulated by endogenous cholinergic ligands and can be affected by nicotine through $\alpha 7$ - and $\alpha 4\beta 2$ -containing nicotinic receptors, which play different roles in the course of these cells maturation [24]. This work was performed with the help of Dr. A. Zverkova from Hematology and Transfusiology Institute, Kyiv.

Returning to B lymphocytes, we were further interested in the mechanism of the nAChRs involvement in regulating their activation in the immune response. To address this question, we investigated the localization of different nAChR subtypes on the B lymphocyte surface in relation to known B lymphocyte markers like B220 (CD45R), CD23, BCR (IgM), CD40 or Fc γ R (CD16/32). B220 seemed to be non-related, since B lymphocyte purification with B220-coated magnetic beads did not affect the nAChR-specific antibody binding. Double staining of purified B lymphocytes with the fluorescently labeled anti-IgM, anti-CD23, anti-CD40 or anti-CD16/32 in the presence of unlabeled antibodies against various nAChR subunits demonstrated that the binding of anti-IgM and anti-CD23 was affected with the antibodies against $\alpha 4$, $\beta 2$ or $\beta 4$ subunits; the binding of anti-CD40 was affected with the antibodies against $\alpha 7$ or $\alpha 9$ subunits, and the binding of Fc γ R-specific antibody was not affected by the nAChR-specific antibodies. It was suggested that $\alpha 4\beta 2(\beta 4)$ nAChRs were located close to BCR and CD23 on the B lymphocyte surface, while $\alpha 7$ and $\alpha 9$ nAChRs were close to CD40. To either confirm or disprove this suggestion, we developed a Sandwich ELISA approach, in which the wells of immunoplates were coated with the antibody against the whole extracellular domain (1-208) of $\alpha 7$ nAChR subunit, while the captured antigen was revealed with $\alpha 7(179-190)$ -specific, IgM-specific or CD40-specific antibodies. The preparations of normal B lymphocytes, SP-2/0 hybridoma cells or mouse brain were used as the source of antigens. In the brain, lacking both IgM and CD40, the captured antigen was detected with $\alpha 7$ -specific antibody only. In SP-2 cells, expressing CD40 but lacking IgM,

the antigen was detected with either $\alpha 7$ -specific or CD40-specific second antibody. In B lymphocytes, the captured antigen was detected with all three antibodies suggesting that the nAChRs were coupled to both IgM and CD40. The whole extracellular domain 1-208 is quite homologous in different alpha subunits; therefore, we could expect that $\alpha 7(1-208)$ -specific antibody bound any nAChR subtype present within the cell lysate. To reveal what nAChR subtypes are coupled to either IgM or CD40 in B lymphocytes, we applied a reverse assay, in which the plates were coated with either anti-IgM or anti-CD40 and the bound antigen was revealed with the antibodies against $\alpha 4$, $\alpha 7$ or $\alpha 9$ nAChR subunits. The antigen captured with anti-IgM was revealed with anti- $\alpha 4$, whereas that captured with anti-CD40 was detected with anti- $\alpha 7$. This data clearly indicated that $\alpha 7$ -containing nAChRs were coupled to CD40, while $\alpha 4\beta 2$ nAChRs to the BCR. The $\alpha 9$ nAChRs were located close to CD40 but not coupled to it.

To assess the functions of $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ and $\alpha 9$ nAChRs in B lymphocytes we studied their proliferation in response to activation with either anti-CD40 or anti-IgM (F(ab)₂ fragments) in the presence or absence of nAChR subtype-specific ligands and in B lymphocytes of the wild-type, $\alpha 7$ -/- or $\beta 2$ -/- mice [18]. It was found that B lymphocytes of both $\alpha 7$ -/- and $\beta 2$ -/- mice responded to anti-CD40 stronger than those of the wild-type mice, whereas the cells of $\beta 2$ -/- mice responded to anti-IgM worse than those of the wild-type or $\alpha 7$ -/- mice. Inhibition of $\alpha 7$ and $\alpha 9$ nAChRs with methyllicaconitine (MLA) resulted in considerable augmentation of CD40-mediated B lymphocyte proliferation in cells of all genotypes; stimulation of $\alpha 4\beta 2$ nAChRs with epibatidine increased the IgM-mediated proliferation of the wild-type and $\alpha 7$ -/-, but not $\beta 2$ -/- cells. Inhibition of $\alpha 9$ nAChRs with α -conotoxin PeAI exerted weak stimulating effect on CD40-mediated proliferation. It was concluded that $\alpha 7$ nAChR fulfills inhibitory CD40-related mitogenic function, $\alpha 4\beta 2$ nAChR produces a stimulatory IgM-related effect, while $\alpha 9$ nAChR is a “reserve” receptor, which partly compensates the absence of $\alpha 7$ nAChR in $\alpha 7$ -/- cells (Fig. 1). In addition, the work of our Italian co-authors (Dr. A. Viola group from University of Milan, Italy) demonstrated that $\alpha 7$ nAChRs were recruited to immune synapse between human T and B lymphocytes, both of which produced acetylcholine. These data indicated that acetylcholine is an additional mediator to modulate activation of interacting T and B lymphocytes.

To reveal if acetylcholine produced by B lymphocytes exerts any effect on the strength of B lymphocyte activation we applied the inhibitors of acetylcholine esterase (piridostigmin, proserin and substance 547), kindly provided by Prof. E. Nikolsky from Kazan State University, Russian Federation. It was found that inhibiting acetylcholine degradation resulted in the decrease in B lymphocyte proliferation stimulated by anti-CD40.

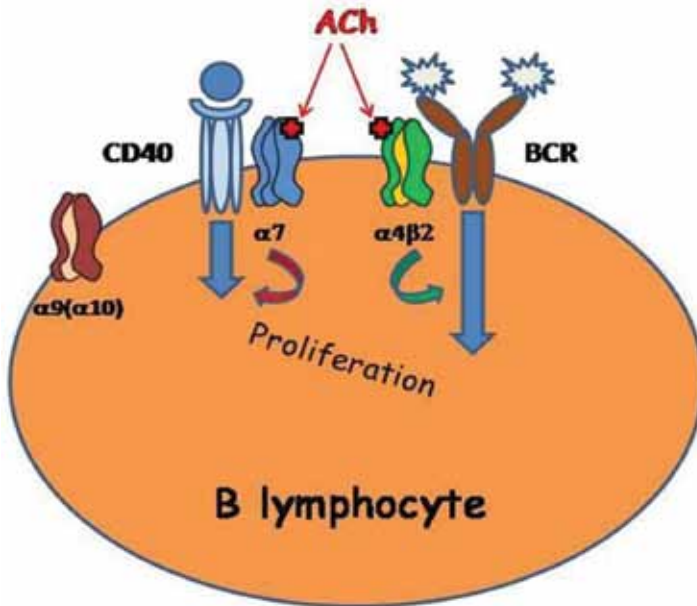


Fig. 1. The scheme of nAChR subtypes localization and functioning in B lymphocytes

Conversely, application of hemicholine-3, which inhibits acetylcholine formation, increased B lymphocyte proliferation [23]. These data clearly demonstrated that endogenous acetylcholine produced by B lymphocytes (the assays were performed in purified B lymphocytes sorted out from the mouse spleen by magnetic procedure) is a negative regulator of their activation.

B lymphocytes are mediators of humoral immunity producing antibodies against invading pathogens. To reveal if the nAChRs are involved in regulating the antibody production by normal B lymphocytes we applied several *in vitro* and *in vivo* approaches.

Mice lacking nicotinic receptor subunits $\alpha 4$, $\beta 2$ or $\alpha 7$ had less serum IgG and IgG-producing cells in the spleen, whereas the numbers of IgM-producing cells and the levels of serum IgM were similar to those in the wild-type mice. Knockout mice also had less antibodies against “natural” antigens like myosin or tubulin [22]. These data indicated that the lack of either $\alpha 4\beta 2$ or $\alpha 7$ nAChR subtypes resulted in the narrowing of B lymphocyte antigen-specific repertoire and, therefore, nicotinic receptors were needed to keep the broad spectrum of antibody specificities. In contrast, mature B lymphocytes of mice lacking $\alpha 4$, $\beta 2$ or $\alpha 7$ nAChR subunits showed stronger IgG response to protein antigen *in vivo* than the wild-type mice that was in accord with the negative regulatory role of acetylcholine

discussed above. Wild-type C57Bl/6 mice, when immunized with bovine cytochrome *c* (cyt *c*) together with $\alpha 7$ -specific inhibitor MLA, demonstrated faster and stronger primary IgM response than mice immunized with cyt *c* alone, but no difference in the secondary IgG response [23]. Consequently, B lymphocytes stimulated with anti-CD40 *in vitro* in the presence or absence of MLA did not show any difference in the IgG to IgM ratio [18]. It was concluded that the presence of (signaling through) nAChRs positively influenced the initial numbers of antigen-specific B lymphocytes but negatively regulated their response to protein antigens and had no effect on the IgM to IgG switch in the course of immune response.

Special efforts have been and are still being applied to reveal the mechanism of nAChR functioning in B lymphocytes. Preliminary data obtained in collaboration with Prof. O. Lukyanetz from Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv and Prof. P. Bregestovsky from Aix-Marseille University suggest that $\alpha 7$ nAChRs expressed in B lymphocytes do not function as classical ion channels, but rather influence signaling of adjacent receptors or initiate separate signaling pathways through conformational perturbations of the nAChR pentamer caused by either agonist or competitive antagonist binding.

Structure and functions of nAChRs in mitochondria

The data obtained demonstrated a crucial role of nAChRs for the humoral immunity. Our further efforts were directed to elucidate the cellular mechanisms underlying the observed effects. Staining with Annexin V and propidium iodide revealed that the bone marrows of $\alpha 7$ -/- mice contained more apoptotic B lymphocyte precursors than those of the wild-type mice [19]. Additional experiments performed with the cells of pre-B lymphocyte-derived chicken DT40 cell line indicated that $\alpha 7$ -specific agonist choline improved the survival of these cells under the effect of H_2O_2 , and its positive influence was prevented by MLA [25]. This data attracted our attention to the role of $\alpha 7$ nAChRs in the cell survival. The $\alpha 7$ nAChRs expressed on the plasma membrane were shown to stimulate pro-survival signaling pathways in various types of cells [7, 26]. Since H_2O_2 is considered to cause apoptosis by affecting mitochondria, we initiated experiments to reveal the possible involvement of nAChRs in mitochondria functioning.

The presence of nicotinic receptors in mitochondria has initially been discussed in connection with the neuroprotective role of nicotine. Then it was shown that nicotine affected mitochondria respiratory chain independent of nAChRs [27]. However, in other studies, the decrease of mitochondria membrane potential caused by ethanol was prevented with specific $\alpha 7$ nAChR agonist 2,4-dimethoxybenzyliden anabasein, and this effect was blocked with MLA [28]. By studying isolated mouse liver mi-

tochondria we demonstrated that functional $\alpha 7$ nAChRs, which had been previously found exclusively on the cell plasma membrane, were expressed in mitochondria outer membrane and regulated early pro-apoptotic events like cyt *c* release [29]. The binding of $\alpha 7$ -specific antibody with mouse liver mitochondria was demonstrated by electron microscopy. Outer membranes of mitochondria from the wild-type and $\beta 2^{-/-}$ but not $\alpha 7^{-/-}$ mice bound $\alpha 7$ nAChR-specific antibody and toxins: FITC-labeled α -cobratoxin or Alexa 555-labeled α -bungarotoxin. Here we applied the two versions of sandwich assays where the nAChRs were captured from the mitochondria membrane preparation with the $\alpha 7(1-208)$ -specific antibody, while the bound antigen was revealed with either an $\alpha 7(179-190)$ -specific antibody or $\alpha 7$ -specific toxin. This work was performed in collaboration with the laboratory of Prof. V. Tsetlin (Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow). $\alpha 7$ nAChR agonists (acetylcholine, choline or PNU-282987) impaired intramitochondrial Ca^{2+} accumulation and significantly decreased cyt *c* release stimulated with either 90 μM CaCl_2 or 0.5 mM H_2O_2 . The effect of agonists was similar to that of inhibitor of voltage-dependent anion channels (VDAC), and VDAC was co-captured with the $\alpha 7$ nAChR from mitochondria outer membrane preparation in sandwich ELISA. It was concluded that $\alpha 7$ nAChRs are expressed in mitochondria outer membrane to regulate the VDAC-mediated Ca^{2+} transport and mitochondrial permeability transition [29]. Similarly to $\alpha 7$ nAChRs expressed in B lymphocytes, those found in mitochondria seemed not to function as classical ion channels, but to influence the adjacent proteins like VDAC through conformational perturbations caused by the binding of either agonist or antagonist molecule (Fig. 2). This data indicated that, in addition to established anti-apoptotic signaling pathways mediated by plasma membrane $\alpha 7$ nAChRs, there is an endogenous, previously unrecognized cholinergic mechanism to control mitochondria functions and their apoptotic susceptibility.

The presence of $\alpha 7$ nAChRs in mitochondria was further confirmed by confocal microscopy studies performed with several human cell lines [30].

The results of subsequent studies, which are now being prepared for publication, demonstrate that anti-apoptotic functioning of $\alpha 7$ nAChRs in mitochondria involves activation of intramitochondrial kinases, first of all, of PI3K/Akt pathway. Moreover, it now becomes evident that $\alpha 7$ is not the only nAChR subtype expressed in mitochondria; others like $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 4\beta 2$ were also found and were demonstrated to maintain mitochondrial integrity similarly to $\alpha 7$ nAChR subtype. Taken together, these findings offer a novel view on the mitochondria protection in apoptosis and open the way for its pharmacological regulation.

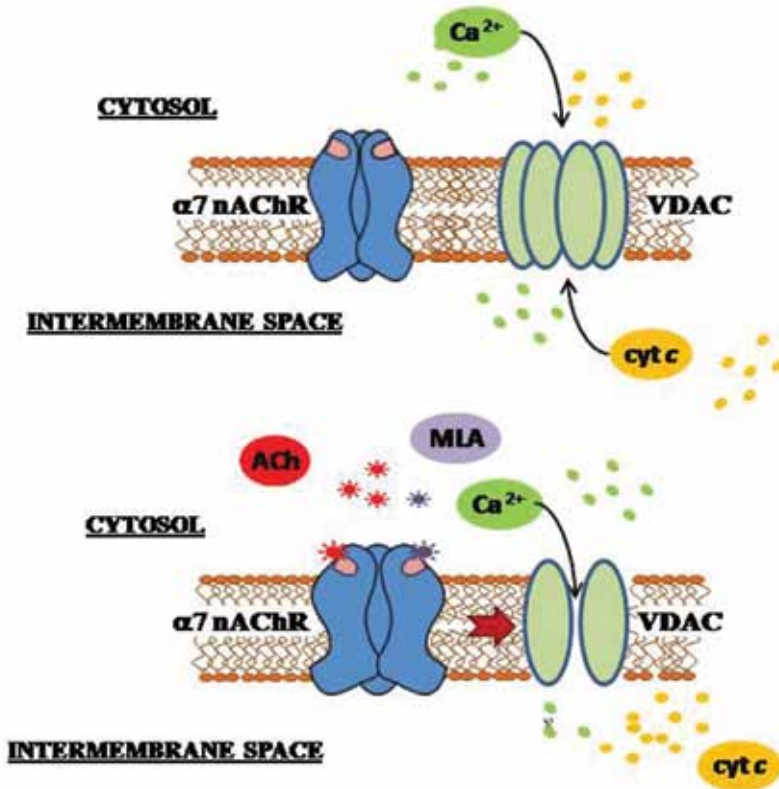


Fig. 2. The scheme of $\alpha 7$ nAChR localization and functioning in the outer membrane of mitochondria

Functional effects of nAChR-specific antibodies and their possible involvement in the development of neurodegenerative disorders like Alzheimer disease

Autoantibodies against nAChRs found in neuro-muscular junctions are the main cause of autoimmune *Myasthenia gravis* [11]. Antibodies against neuronal nAChR subtypes have been found upon several forms of gangliopathy [31]. The brain has been for a long time considered defended from immune attacks by the blood-brain barrier. However, more and more data indicate that this defense is not absolute, and the antibodies and even lymphocytes can penetrate the brain upon pathological conditions.

Alzheimer disease (AD) is a neurodegenerative pathology, which develops in elderly people as a form of dementia accompanied by the impairments of memory, space orientation, speaking and practical habits. Pathogenesis of AD is characterized by the appearance of aberrant forms

of beta-amyloid (A β 1-42) producing extracellular insoluble inclusions (“plaques”). It is also accompanied with the cholinergic deficit and the loss of α 4 β 2 and α 7 nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in the brain neurons [32]. However, the exact reasons for this loss were not completely understood. We hypothesized that a reduction of nAChRs in the brain might be due to immune mechanism involving nAChR-specific autoantibodies.

To test this we either immunized mice with an extracellular domain of α 7 nAChR subunit (α 7(1-208)) or injected them with α 7(1-208)-specific antibodies generated in rabbits and examined the density of nAChRs both in peripheral tissues and within the brain, as well as the functional consequences of immunization/antibody injection. The recombinant α 7(1-208) domain was produced in the laboratory of Prof. S. Tzartos from Hellenic Pasteur Institute in Athens. It was found that injected α 7(1-208)-specific antibodies decreased the α 7 nAChR density on mouse B lymphocytes and the numbers of Annexin V-positive B lymphocytes in the spleen. Immunization of mice with α 7(1-208) resulted in connective tissue overgrowth and infiltration of segmented neutrophils in the spleen (studied with the help of Dr. S. Pavlovich from Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv), as well as in decreased body weight compared to mice immunized with BSA. It was concluded that α 7 nAChR-specific antibodies were functionally active regulating the lymphocyte survival, neutrophil migration, connective tissue growth and body weight (Fig. 3, lower part) [33].

Further studies demonstrated that α 7(1-208)-specific antibodies were able to cross the blood-brain barrier to decrease the α 7 nAChR density in certain brain regions of mice. Antibody injection resulted in brain nAChR decrease only if mice were co-injected with bacterial lipopolysaccharide. Brain sections of immunized mice were analyzed for the binding of [¹²⁵I]- α -bungarotoxin and [¹²⁵I]-epibatidine. A decrease in α -bungarotoxin binding *in striatum (nucleus accumbens and caudate putamen)* accompanied with an increase of epibatidine binding in the forebrain and *caudate putamen* was observed in mice immunized with α 7 nAChR domain compared to those immunized with BSA. Mice immunized with α 7(1-208) demonstrated significantly worse episodic memory compared to non-immunized animals but did not differ from the controls in locomotor or anxiety-related tests. These results showed that nAChR-specific antibodies penetrating the brain upon induced inflammation caused a decrease of brain α 7 nAChRs and worsened the memory behavior of immunized mice. These experiments were performed in collaboration with Dr. I. Cloez-Tayarani and Dr. S. Granon from Pasteur Institute, Paris [34].

We further asked if the antibodies of similar specificity can be found in humans; if yes, what stimulates their production; and whether the

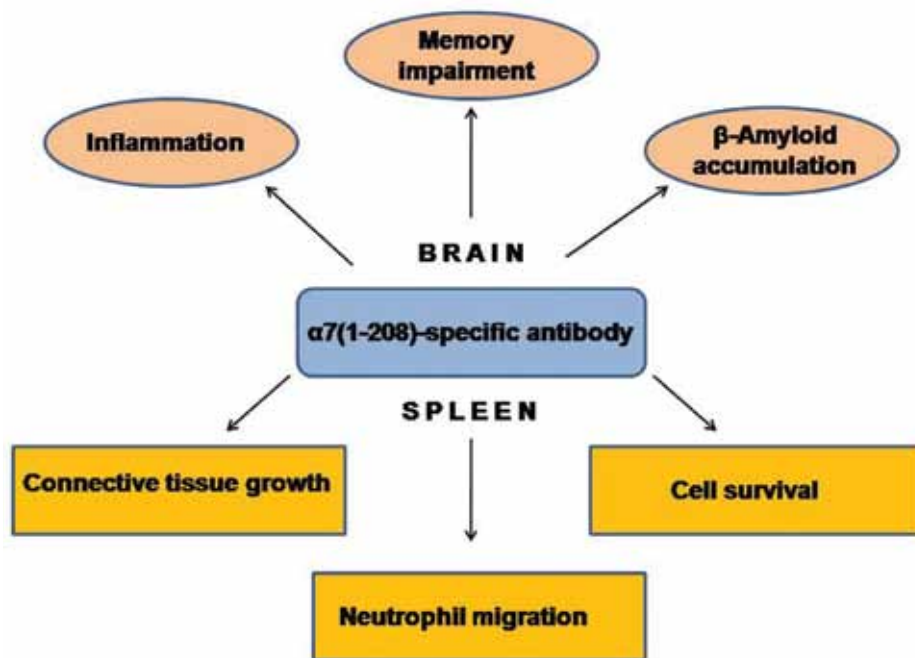


Fig. 3. The effects of $\alpha 7(1-208)$ -specific antibody performed in the brain and spleen

presence of such antibodies is related to Alzheimer disease. For this purpose, we examined several groups of people including healthy individuals of various age, children suffering from respiratory diseases and Alzheimer patients with different forms of AD. The blood samples were provided by Prof. S. Tzartos (Hellenic Pasteur Institute, Athens), Prof. N. Bachinskaya (Institute of Gerontology, Kyiv) and Mrs Hanna Kravtsova (Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology, Kyiv). The antibodies capable to bind $\alpha 7(1-208)$ were found in the blood of both healthy humans and AD patients. In healthy individuals, their capacity to compete with [125 -I]- α -bungarotoxin for the binding to $\alpha 7(1-208)$ increased with age. The level of such antibodies was significantly elevated in children with severe form of obstructive bronchitis. We also observed generation of such antibodies in mice injected with Lewis lung carcinoma cells expressing both $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nAChRs. Among AD patients, the level of $\alpha 7$ nAChR-specific antibodies was significantly larger in people 62.5 ± 1.5 years old with moderate or severe AD stages (15.2 ± 1.3 MMSE scores) compared to those of 76 ± 1.5 years old with the mild (22.7 ± 0.1 MMSE scores) AD stage. It was concluded that $\alpha 7(1-208)$ nAChR-specific antibodies found in the human blood had been formed as a result of common infections accompanied with the destruction of respiratory epithelium. Elevated blood plasma levels

of $\alpha 7(1-208)$ nAChR-specific antibodies were characteristic of the early-onset AD and, therefore, were suggested as one of the risk factors for the development of this form of the disease [35]. These experiments are now being continued to reveal if prolonged presence of $\alpha 7(1-208)$ -specific antibodies in the brain can cause neurodegeneration and accumulation of aberrantly processed β -amyloid, which was shown to be coupled to $\alpha 7$ nAChR. Preliminary yet unpublished data allow suggesting that $\alpha 7(1-208)$ -specific antibodies cause redistribution of nAChR subtypes in the brain, affect susceptibility of brain mitochondria to apoptogenic stimuli and favor accumulation of β -amyloid both in the cells and mitochondria of the brain. Additional experiments performed in human glioblastoma U373 cell line demonstrated that antibodies specific to the extracellular epitope of $\alpha 7$ nAChR subunit stimulated production of interleukin-6 and, therefore, could be regarded as pro-inflammatory agents for the brain astrocytes.

Taken together, the results obtained clearly demonstrated that $\alpha 7$ -specific antibodies were physiologically active and could both influence the level of corresponding nAChRs expressed on the cell surface and stimulate intracellular processes favoring local neuroinflammation and β -amyloid accumulation (Fig. 3, upper part).

In conclusion, experiments performed in our group during the last decade revealed that nAChRs play an important role in humoral immunity. Being expressed in B lymphocytes, they regulate both the formation of their antigen-specific repertoire in the course of development and activation in mature state. Different nAChR subtypes are present along with the B lymphocyte maturation: $\alpha 4\beta 2$ nAChRs are prevalent in immature B lymphocytes within the bone marrow, while $\alpha 7$ nAChRs are mostly found in mature B lymphocytes in the spleen. Possibly, this difference corresponds to different kinds of nAChR agonists present in the primary *vs* secondary lymphoid organs. The bone marrow is innervated with cholinergic nerve fibers; therefore, differentiation of the blood cells can be regulated with neuronal acetylcholine through $\alpha 4\beta 2$ nAChRs sensitive to nanomolar doses of this agonist. In contrast, the spleen has no cholinergic innervation; therefore, the nAChRs expressed in mature B lymphocytes can be stimulated (or desensitized) either by choline, which is an $\alpha 7$ -specific agonist, or by acetylcholine produced by activated T and B lymphocytes and affecting them locally within the immune synapse. $\alpha 4\beta 2$ nAChRs are localized in close proximity to the antigen-specific receptor (BCR) and positively regulate its involvement in B lymphocyte differentiation. $\alpha 7$ nAChRs are located close to CD40 and negatively regulate its signaling in the course of B lymphocyte activation. $\alpha 9$ nAChRs comprise a minor population capable of fulfilling functions similar to those of $\alpha 7$ nAChRs and partially substitute them in $\alpha 7$ -/- animals. In whole, the data obtained

delineate the role of cholinergic mechanisms in humoral immunity underlying the observed immunosuppression in smokers constantly consuming nAChR agonist nicotine.

One of the ways through which the nAChRs are involved in B lymphocyte differentiation is the support of cell survival. Our data have revealed that, in addition to established pro-survival signaling pathway starting from a plasma membrane $\alpha 7$ nAChR, there is an intracellular pathway engaging the nAChRs expressed in mitochondria outer membrane. This is the first example of functional nAChRs expressed in the intracellular organelles. Possibly, it belongs to the most ancient survival mechanisms inherited by mitochondria from their hypothetical prokaryotic ancestor. This novel finding raises a lot of questions concerning the mechanisms of the nAChR targeting to and functioning in mitochondria that is the subject of ongoing studies.

Finally, we have found that antibodies raised against extracellular portions of nAChR subunits are not only reliable tools to study the nAChR exposure on the cells or mitochondria, but play a significant physiological role *in vivo*. Most importantly, they are able to penetrate the brain and to impair memory with subsequent loss of brain $\alpha 7$ nAChRs and accumulation of β -amyloid. The documented presence of such antibodies in humans and their relation to the early-onset AD suggests a pronounced immunological component in pathogenesis of AD.

This work has been performed in the Department of Molecular Immunology of Palladin Institute of Biochemistry headed by Professor Sergiy Komisarenko, the main contributors being Drs Olena Lykhmus, Lyudmyla Koval, Galyna Gergalova and Olena Kalashnyk.

References

1. Bamel K., Gupta S. C., Gupta R. // *Life Sci.* – 2007. – **80**. – P. 2393–2396.
2. Kawashima K., Fujii T. // *J. Pharmacol. Sci.* – 2008. – **106**. – P. 167–173.
3. Kummer W., Lips K. S., Pfeil U. // *Histochem. Cell Biol.* – 2008. – **130**. – P. 219–234.
4. Bocquet N., Prado de Carvalho L., Cartaud J. et al. // *Nature.* – 2007. – **445**. – P. 116–119.
5. Changeux J. P. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – **287**. – P. 40207–40215.
6. Albuquerque E. X., Pereira E. F., Alkondon M., Rogers S. W. // *Physiol. Rev.* – 2009. – **89**. – P. 73–120.
7. Parada E., Egea J., Romero A. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – **49**. – P. 1815–1821.
8. Chernyavsky A. I., Arredondo J., Marubio L. M., Grando S. A. // *J. Cell. Sci.* – 2004. – **117**. – P. 5665–5679.

9. *Arias H. R., Richards V. E., Ng D. et al.* // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2009. – **41**. – P. 1441–1451.
10. *Filippini P., Cesario A., Fini M. et al.* // *Curr. Drug Targets.* – 2012. – **13**. – P. 644–655.
11. *Lindstrom J. M.* // *Muscle Nerve.* – 2000. – **23**. – P. 453–477.
12. *Wakkach A., Guyon T., Bruand C. et al.* // *J. Immunol.* – 1996. – **157**. – P. 3752–3760.
13. *Holt P.G., Keast D.* // *Bacteriol. Rev.* – 1977. – **41**. – P. 205–216.
14. *Skok M. V., Voitenko L. P., Voitenko S. V.* // *Neuroscience.* – 1999. – **93**. – P. 1437–1446.
15. *Koval O. M., Voitenko L. P., Skok M. V. et al.* // *Neurosci. Lett.* – 2004. – **365**. – P. 143–146.
16. *Shelukhina I. V., Kryukova E. V., Skok M. V. et al.* // *Biochemistry (Moscow).* – 2006. – **71**. – P. 744–758.
17. *Skok M., Lykhmus E., Bobrovnik S. et al.* // *J. Neuroimmunol.* – 2001. – **121**. – P. 59–66.
18. *Koval L., Lykhmus O., Zhmak M. et al.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2011. – **43**. – P. 516–524.
19. *Skok M. V., Grailhe R., Agenes F., Changeux J.-P.* // *J. Neuroimmunol.* – 2006. – **171**. – P. 86–98.
20. *Коваль Л. М., Романюк С. І., Колибо Д. В. та ін.* // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 2. – P. 105–111.
21. *Skok M. V., Kalashnik E. N., Koval L. N. et al.* // *Mol. Pharmacol.* – 2003. – **64**. – P. 885–889.
22. *Skok M. V., Grailhe R., Changeux J.-P.* // *Eur. J. Pharmacol.* – 2005. – **517**. – P. 246–251.
23. *Koval L. M., Lykhmus O. Yu., Omelchenko D. M. et al.* // *Ukr. Biochim. Zh.* – 2009. – **81**, N 4. – P. 5–11.
24. *Koval L. M., Zverkova A. S., Grailhe R. et al.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2008. – **40**. – P. 980–990.
25. *Омельченко Д. М., Калашник О. М., Коваль Л. М. та ін.* // *Ukr. Biochim. Zh.* – 2009. – **81**, N 1. – P. 59–66.
26. *Parada E., Egea J., Romero A. et al.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – **49**. – P. 1815–1821.
27. *Cormier A., Morin C., Zini R.* // *Brain Res.* – 2001. – **900**. – P. 72–79.
28. *Li Y., Meyer E. M., Walker D. W. et al.* // *J. Neurochem.* – 2002. – **81**. – P. 853–858.
29. *Gergalova G. L., Lykhmus O. Yu., Kalashnyk O. M. et al.* // *PLoS ONE.* – 2012. – **7**. – e31361.
30. *Kalashnyk O. M., Gergalova G. L., Komisarenko S. V., Skok M. V.* // *Life Sci.* – 2012. – **91**. – P. 1033–1037.
31. *Winston N., Vernino S.* // *Curr. Opin. Neurol.* – 2010. – **23**. – P. 514–518.
32. *Hellstrom-Lindahl E., Mousavi M., Zhang X. et al.* // *Mol. Brain Res.* – 1999. – **66**. – P. 94–103.
33. *Lykhmus O., Koval L., Pavlovyeh S. et al.* // *Immunology Letters.* – 2010. – **128**. – P. 68–73.

34. Lykhmus O. Yu., Koval L. M., Skok M. V. et al. // J. Alz. Dis. – 2011. – **24**. – P. 693–704.
35. Koval L., Lykhmus O., Kalashnyk O. et al. // J. Alz. Dis. – 2011. – **25**. – P. 747–761.

SEEING IS BELIEVING! LIVE CONFOCAL IMAGING OF MICROVASCULAR NETWORKS *IN SITU*: MORPHOLOGY, Ca²⁺ SIGNALLING AND TONE

T. BURDYGA, L. BORYSOVA

Department of Cellular and Molecular Physiology, Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, Crown street, Liverpool, L69 3BX, UK

2- and 3-dimensional confocal imaging of Fluo-4 loaded ureteric microvessels in situ allowed us to demonstrate distinct morphology, Ca²⁺ signalling and contractility in myocytes of arcade arterioles and pericytes of arcade venules. In myocytes and pericytes, Ca²⁺ signals arise exclusively from Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum through inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Ca²⁺ transients in pericytes are less oscillatory, slower and longer-lasting than those in myocytes. The data obtained suggest differences in the mechanisms controlling local blood flow in precapillary arterioles and post-capillary venules.

1. Confocal imaging of microvascular networks *in situ*

Imaging of microvascular networks *in situ* is a dream of any vascular physiologist and has always been technically challenging until recently when techniques of live imaging of intact microvessels in intact tissue [1, 2] or tissue slices [3] have been developed. A range of fluorescent, Ca²⁺-sensitive dyes along with a chemical strategy allowing them to be easily introduced into intact cells have been developed [4]. The most successful of these compounds for confocal imaging were non-ratiometric Ca²⁺ sensitive indicators fluo-3 and fluo-4. The development of confocal microscopy and high-speed sensitive CCD-based cameras made possible to visualise local and global changes in [Ca²⁺]_i within individual cells. Confocal microscopy uses laser excitation of cell fluorescence with a pinholes, which excludes out-of-focus light. This allows to obtain clear optical sections from much thicker tissues samples. Seeing live images of the tiniest blood vessels in the tissue is an absolutely amazing and exciting experience and provides unique opportunity to investigate Ca²⁺ signalling and vasomotor responses in intact microvessels in their natural environment in an accessible and stimulating way. The invisible becomes visible, revealing exceptional beauty of morphology and exciting heterogeneity of Ca²⁺ signalling in cellular and subcellular levels in myocytes, pericytes and endothelial cells of microvessels. It is well exemplified by comparing morphology and Ca²⁺ signalling of precapillary arcade arterioles and postcapillary arcade venules, which parallel each other but belong to different parts of microvascular networks.

Traditionally precapillary arterioles are seen as small resistance microvessels, involved in control of tissue blood flow, while postcapillary venules are known to play a key role in control of extravasation of white blood cells in response to infection or inflammation [5]. Close proximity of these anatomically and physiologically different microvessels gives a unique opportunity to compare their morphology, Ca^{2+} signalling and vasomotor responses to central and local vasoconstrictors and vasodilators under identical experimental conditions, which will be briefly discussed in the current paper.

2. Morphology of the arcade arterioles and venules

Figure 1 A shows confocal images of fluo-4 loaded arteriole/venule pair ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nM}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nM}$), obtained by the method developed in our laboratory using Nipkow disc based confocal imaging system (For details see [1, 2]). Figure 1A shows distinct morphology of arterioles and venules. The wall of the arteriole has a single layer of closely opposed, circularly orientated myocytes (Fig. 1Ai). Smooth muscle cells are spindle shaped and depending on the diameter of the arteriole can make up to 2

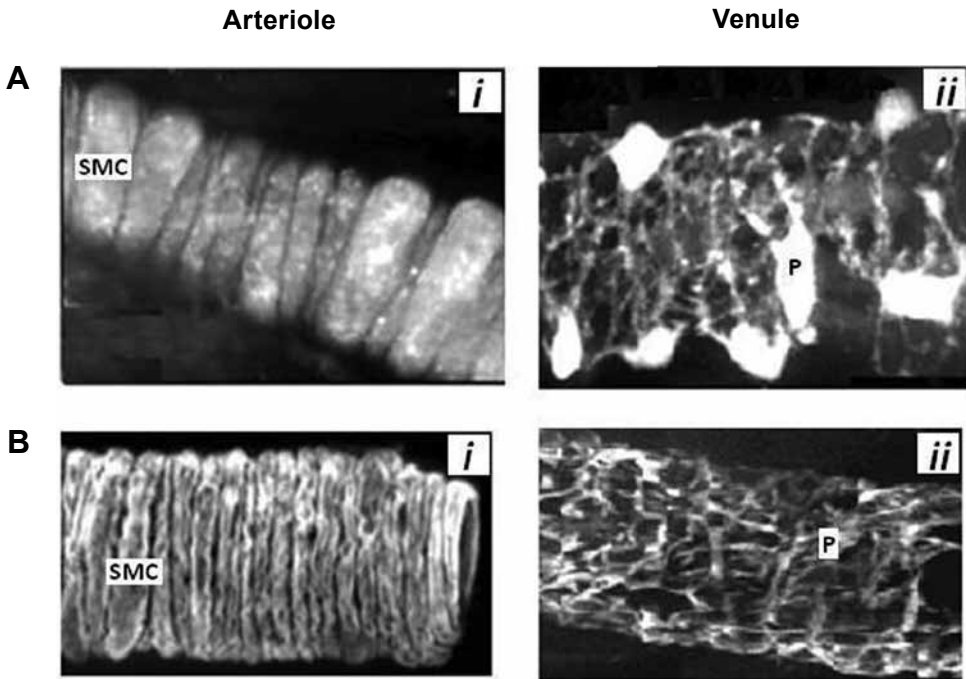


Fig. 1. Live images of ureteric arcade arteriole and arcade venule in situ. **A:** Images of fluo-4 loaded arcade arteriole and venule. **B:** Images of arcade arteriole and venule stained with phalloidin, SMC – smooth muscle cells; P – pericytes

full turns around endothelium [2]. The postcapillary arcade venules are surrounded by spidery pericytes, with stellate cell bodies giving slender cell projections (Fig. 1Aii). These projections appear to be randomly oriented with respect to the vessel axis, and overlap and/or attach to each other, forming a complicated and dense (Fig. 1Aii). The processes interconnect with each other leaving large gaps between them of different shapes and sizes (Fig. 1Aii). These live morphological data are in good agreement with those obtained with scanning electron microscopy [6, 7].

Both arteriolar myocytes and venular pericytes were stained *in situ* with fluorescently labelled phalloidin in order to detect α -actin filaments in the cells. Our data are in agreement with previous observations of Nehls and Drenckhahn [8]. Both myocytes and pericytes of arcade arterioles and venules were stained positively for α -actin (Fig. 1Bi, ii), suggesting both media cells in these microvessels are contractile. The next we characterized Ca^{2+} signalling in myocytes and pericytes and related it to contraction in arterioles and venules, respectively.

3. Ca^{2+} responses of arteriolar myocytes and venular pericytes to caffeine, phenylephrine and endothelin-1

3.1. Effects of caffeine

Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum (SR), mediated by ryanodine receptors (RyRs) channels, can appear as Ca^{2+} sparks or waves and was shown to play a key role in control of vascular tone in small resistance arteries [9]. Caffeine is a known activator of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) from the SR mediated by RyRs channels. By using caffeine we aimed to answer the question whether myocytes of arcade arterioles and pericytes of arcade venules possess functional RyRs. Caffeine (1-2 mM) induced Ca^{2+} oscillations in arteriolar myocytes, which showed variable amplitudes and spatial spread but had no effect even in high concentrations (20 mM) on Ca^{2+} signalling in venular pericytes (Fig. 2Aii). These data demonstrate the presence of functional RyRs channels in myocytes of arcade arterioles, where they can be involved in control of local and global Ca^{2+} signalling but not in pericytes of arcade venules.

3.2. Effects of phenylephrine

The venous vessels have been reported to have no sympathetic nerve supply and show no change in diameter when the sympathetic supply to the muscle is activated [10].

We have used a non-hydrolysable analogue of noradrenalin, phenylephrine (PE) to investigate responsiveness of arteriolar myocytes and venular pericytes to topical application of catecholamine. In myocytes of

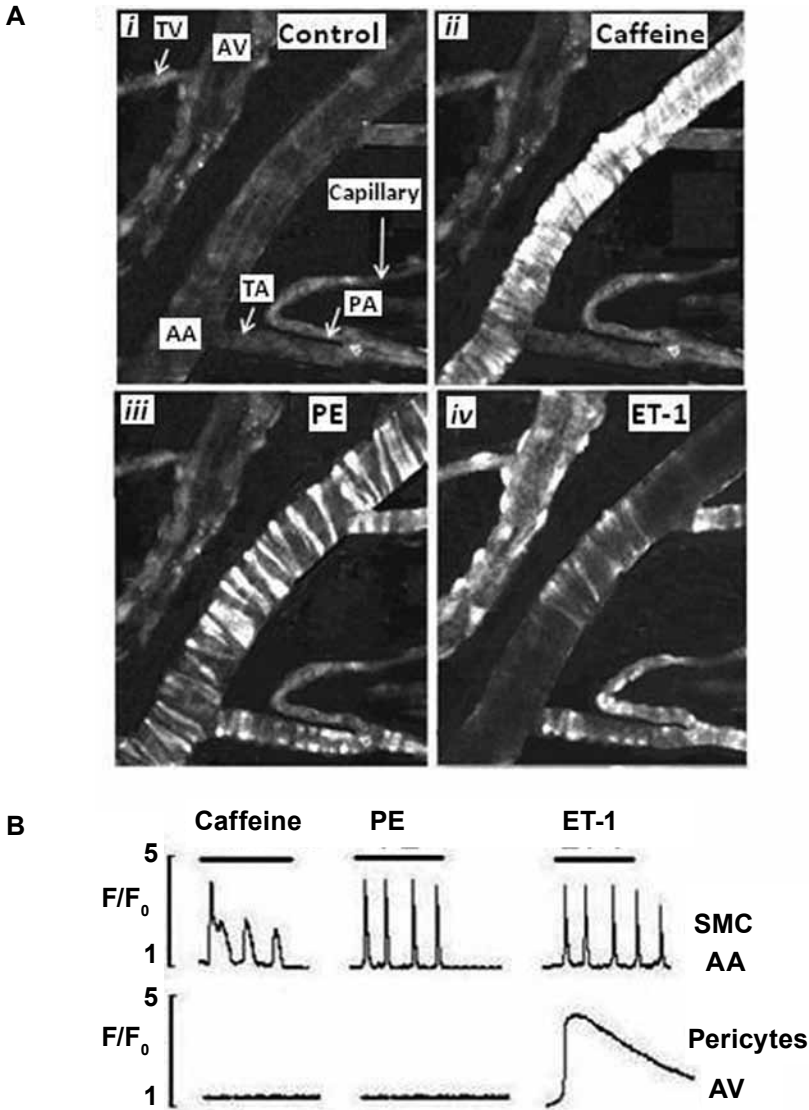


Fig. 2. Effects of caffeine, phenylephrine and endothelin-1 on Ca^{2+} responses of ureteric microvascular network in situ. **A:** Images of ureteric microvascular network in situ showing Ca^{2+} responses of myocytes of arcade arteriole (AA) and pericytes of arcade venules (AV) to 5 mM caffeine (ii), 5 μ M phenylephrine (PE, iii), and 5 nM endothelin-1 (ET-1, iv). **B:** Graph showing Ca^{2+} transients induced by caffeine (2 mM), PE (5 μ M) and ET-1 (5 nM) in myocytes of AA and pericytes of AV. Note that caffeine and PE produced Ca^{2+} oscillations in myocytes of AA but had no effect on pericytes of AV. ET-1 induced Ca^{2+} oscillations in myocytes of AA and long lasting Ca^{2+} transient in pericytes of AV. TV – transverse venules, TA – transverse arterioles, PA – precapillary arterioles

arcade arterioles as we reported before [2] PE (5-10 μM) induced asynchronous Ca^{2+} oscillations, which appeared as propagating Ca^{2+} waves (Fig. 2Aiii and 2B). Pericytes of the arcade venules were totally immune to PE (Fig. 2Aiii and 2B), which agrees with the *in vivo* studies [10].

3.3. Effects of endothelin-1

We have studied the effects of endothelin-1 (ET-1), a highly potent endothelium-derived vasoconstrictor on Ca^{2+} signals and contractility of arteriolar myocytes and venular pericytes. In myocytes of arcade arteriole ET-1 (5 nM) induced asynchronous Ca^{2+} oscillations, appeared as phasic propagating Ca^{2+} waves and accompanied by vasomotion, similar to those induced by PE (Fig. 2Aiv, 2B). Pericytes also strongly responded to ET-1 with the large increase in intracellular Ca^{2+} , which appeared as a long

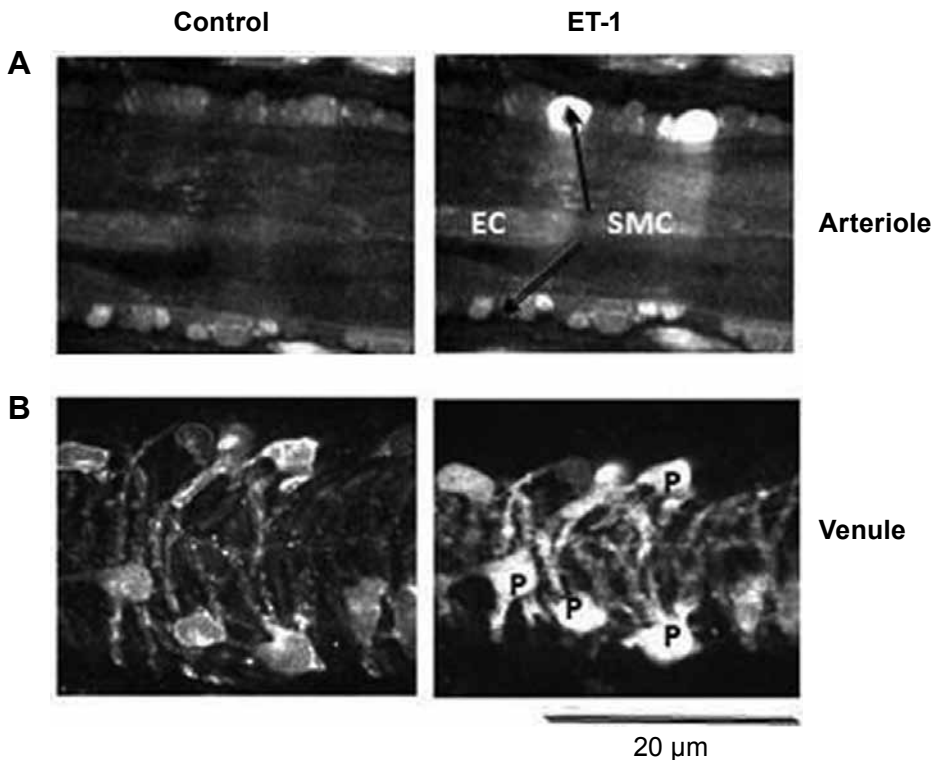


Fig. 3. Effects endothelin-1 on Ca^{2+} transients and contractility of myocytes of arcade arteriole and pericytes of arcade venules in situ. Note that asynchronous Ca^{2+} oscillations in myocytes (SMC) are associated with the regional vasomotion while the long lasting Ca^{2+} transient in pericytes (P) is accompanied by strong venoconstriction. EC – endothelial cells

lasting Ca^{2+} transient (Fig. 2Aiv and 2B). This steady state rise of intracellular Ca^{2+} produced strong venoconstriction induced by contraction of the pericytes' processes (Fig. 3B). Our data demonstrate distinct mechanisms, controlling Ca^{2+} signalling in myocytes and pericytes induced by the same agonist.

The application of Ca^{2+} -imaging technology allowed us to demonstrate distinct mechanisms controlling Ca^{2+} signalling in myocytes and pericytes of arcade arterioles and venules, respectively. The highly dynamic responses evoked in smooth muscle cells by ET-1, for example, suggest that Ca^{2+} waves-like oscillations in myocytes control phasic contractile responses in arterioles but long lasting Ca^{2+} transient in pericytes control tonic contractile responses in venules. The future studies are needed to investigate the mechanisms controlling Ca^{2+} signalling and contractile activity in myocytes and pericytes.

Acknowledgements

This work was supported by British Heart Foundation PG/12/62/29823.

References

1. *Burdyga T., Shmygol A., Eisner D. A., Wray S.* // Cell Calcium. – 2003. – **34**. – P. 27–33.
2. *Borisova L., Wray S., Eisner D. A., Burdyga T.* // Circ. Res. – 2009. – **105**. – P. 803–810.
3. *Perez J. F., Sanderson M. J.* // J. Gen. Physiol. – 2005. – **125**. – P. 555–567.
4. *Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y.* // J. Biol. Chem. – 1985. – **260**. – P. 3440–3450.
5. *De Backer D., Ospina-Tascon G., Salgado D. et al.* // Intensive Care Med. – 2010. – **36**. – P. 1813–1825.
6. *Fujiwara T., Tenkova T. I., Kondo M.* // Anat. Rec., –1999. – **254**. – P. 261–268.
7. *Higuchi K., Hashizume H., Aizawa Y., Ushiki T.* // Arch. Histol. Cytol. – 2000. – **63**. – P. 115–126.
8. *Nehls V., Drenckhahn D.* // J. Cell Biol. – 1991. – **113**. – P. 147–154.
9. *Nelson M. T., Cheng H., Rubart M. et al.* // Science. – 1995. – **270**, N 5236. – P. 633–637.
10. *Marshall J. M.* // J. Physiol. – 1982. – **332**. – P. 169–186.

CALIXARENE METHYLENE BISPHOSPHONIC ACIDS AS PROMISING EFFECTORS OF BIOCHEMICAL PROCESSES

S. V. KOMISARENKO¹, S. O. KOSTERIN¹,
E. V. LUGOVSKOY¹, V. I. KALCHENKO²

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

²Institute of Organic Chemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: vik@ioch.kiev.ua

This interdisciplinary study, performed with participation of research workers of Palladin Institute of Biochemistry and Institute of Organic Chemistry of NAS of Ukraine, is devoted to analysis of biochemical effects of some calixarene methylene bisphosphonic acids (cyclic phenol oligomers) on two well-known biological phenomena – Mg²⁺-dependent ATP hydrolysis (myosin subfragment-1 of myometrium smooth muscle was used as an example) and fibrin polymerization.

Calix[4]arene C-97 (calix[4]arene methylene bisphosphonic acids) is a macrocyclic substance, which contains intramolecular highly ordered lipophilic cavity formed by four aromatic rings, one of which is functionalized at the upper rim with methylene bisphosphonic group. At concentration of 100 μM, this substance was shown to effectively inhibit ATPase activity of pig myometrium myosin subfragment-1 (inhibition coefficient $I_{0.5} = 83 \pm 7 \mu M$). At the same time, this calix[4]arene causes significant (vs. control) increase of myosin subfragment-1 hydrodynamic diameter, which may indicate formation of an intermolecular complex between calixarene and myosin head. Computer simulation methods (docking and molecular dynamics with addition of grid technologies) enabled to elucidate the grounds of intermolecular interactions between calix[4]arene C-97 and myometrium myosin subfragment-1, that involve hydrophobic, electrostatic and π - π -stacking interactions, some of which are close to the ATPase active centre. In view of the ability of calixarenes to penetrate into the cell and their low toxicity, the results obtained may be used as a basis for further development of a new generation of supramolecular effectors (starting from the above mentioned substances, in particular calix[4]arene C-97) for regulation of smooth muscle contractile activity at the level of ATP dependent actin-myosin interaction.

Calix[4]arenes bearing two or four methylenebisphosphonic acid groups at the macrocyclic upper rim have been studied with respect to their effects on fibrin polymerization. The most potent inhibitor proved to be calix[4]arene

tetrakis-methylene-bis-phosphonic acid (C-192), in which case the maximum rate of fibrin polymerization in the fibrinogen + thrombin reaction decreased by 50% at concentrations of $0.52 \cdot 10^{-6}$ M (IC_{50}). At this concentration, the molar ratio of the compound to fibrinogen was 1.7 : 1. For the case of desAB fibrin polymerization, the IC_{50} was $1.26 \cdot 10^{-6}$ M at a molar ratio of C-192 to fibrin monomer of 4 : 1. Dipropoxycalix[4]arene bis-methylene-bis-phosphonic acid (C-98) inhibited fibrin desAB polymerization with an $IC_{50} = 1.31 \cdot 10^{-4}$ M. We hypothesized that C-192 blocks fibrin formation by combining with polymerization site 'A' (Aa17–19), which ordinarily initiates protofibril formation in a 'knob-hole' manner. This suggestion was confirmed by an HPLC assay, which showed a host–guest inclusion complex of C-192 with the synthetic peptide Gly-Pro-Arg-Pro, an analogue of site 'A'. Further confirmation that the inhibitor was acting at the initial step of the reaction was obtained by electron microscopy, with no evidence of protofibril formation being evident. Calixarene C-192 also doubled both the prothrombin time and the activated partial thromboplastin time in normal human blood plasma at concentrations of $7.13 \cdot 10^{-5}$ and $1.10 \cdot 10^{-5}$ M, respectively. These experiments demonstrate that C-192 is a specific inhibitor of fibrin polymerization and blood coagulation and can be used for the design of a new class of antithrombotic agents.

One of most important methodological approaches, applied in molecular and cellular technologies in biochemistry, molecular biology and biophysics, that is focused on the study of structural and functional properties of biomolecules, supramolecular complexes and subcellular and membrane structures, is based on the use of natural and artificial effectors *E* (activators and inhibitors) for modifying activities of enzymatic, transport, regulator and signaling proteins. Therefore, studying physicochemical and biochemical basis and mechanisms involving interactions of small effector molecules with biomacromolecules and biomembranes has become currently one of the basic problems of so called "contact biology". It would be no exaggeration to say that "contact" events play a crucial role in realization of practically all fundamental biological phenomena that are studied by transdisciplinary sciences of chemico-biological direction.

It is obvious that an artificial effector *E* pretending to form a "molecular platform" able to effectively regulate the functional activity of an intracellular protein must satisfy, as minimum, the following conditions: 1) to be nontoxic and non-immunogenic for the organism; 2) to penetrate rather well through the plasmatic cellular membrane; 3) to function as a reversible mechanism; 4) to show a specific (selective) effect exactly on a specific protein; 5) to be characterized by a relatively high affinity towards a target protein (effector constant $K_e < 10^{-5}$ M).

In the context of the above mentioned, much attention of researches is currently devoted to phenol cyclic oligomers, calixarenes, as perspective artificial effectors for different biochemical processes.

Calixarenes [1] are vase shaped macrocyclic compounds produced synthetically by precise cyclo-condensation of *p*-substituted phenols and formaldehyde, which possess intramolecular lipophilic cavities formed by aromatic rings of the macrocyclic skeleton (Fig. 1). Calixarenes may be easily functionalized at the upper or lower rims of the macrocyclic skeleton.

Due to their ability to form a variety of interactions – multi-site hydrogen bonding, specific stacking, and generalized electrostatic interactions – calixarene derivatives can be applied as valid recognition motifs when developing synthetic supramolecular systems. They have the unique ability to recognize and bind to the Host-Guest supramolecular complexes, cations, anions and neutral molecules of appropriate size and architecture [2]. These properties open wide perspectives for practical application of calixarenes in different branches of chemistry, physics and biology [3, 4].

During the last 10 years, calixarene derivatives, especially water soluble and amphiphilic ones, have been the subject of growing interest in the field of biology. Highly diverse biomedical applications of these molecules now include antibacterial, anticancer, antiviral, antithrombotic, membranotropic activities, selective enzyme blocking and mimicking, as well as protein complexation [5]. Calixarenes, substituted at the upper or/and lower macrocyclic rim with biologically active functional groups, are considered as promising compounds for treating many diseases [6].

We were interested in modifying the calixarene platform by bio-inspired methylene bisphosphonates. Being structural analogs of natu-

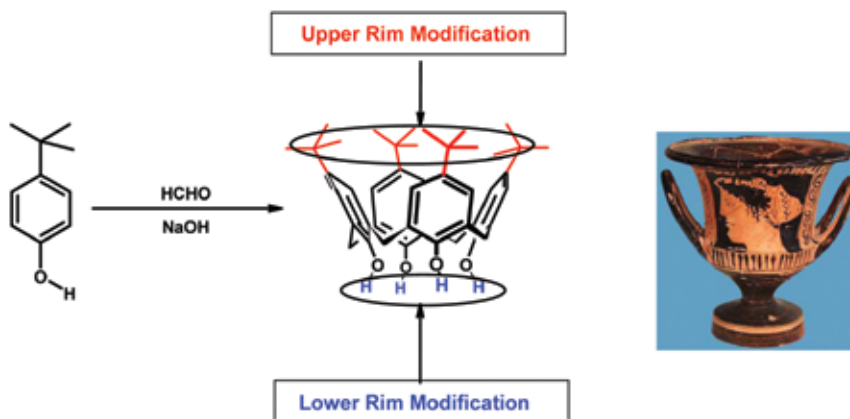


Fig. 1. Synthesis and structure of calix[4]arene

ral pyrophosphate, these compounds demonstrate versatile bioactivities [7, 8]. The bioactivities of bisphosphonates were investigated in details by S. Komisarenko in the Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine. There were revealed and carefully examined antitumor and immunomodulating activities of methylene bisphosphonic acid (MBPHA) (Fig. 2) [9, 10].

Phosphonates and bisphosphonates are structural analogs of inorganic pyrophosphate (PP_i) and phosphate, accordingly; they were chosen for the study *a priori* in consideration of the fact that PP_i takes part as a product or substrate in a large number of most important enzymatic reactions. It also may be found in many metabolites. The presence of P–C bonds in phosphonates and P–C–P bonds in bisphosphonates, which usually cannot be hydrolyzed by enzymes, and strong complex forming abilities of phosphonates suggest that these substances may be used for perturbation of cell metabolic pathways; although, according to some literature data, bisphosphonates do not influence the activity of a large quantity of enzymes, in particular pyrophosphatase. Unlike this opinion, S. Komisarenko et al. showed that bisphosphonates were effective inhibitors of inorganic pyrophosphatase and some other enzymes in reactions involving inorganic pyrophosphate [11–16]. There was also shown antitumor effect of MBPHA – the property, which needed further analysis and preclinical investigations. In particular, there were investigated the mechanism of bisphosphonate effect and dependence of enzyme activities on the structure of bisphosphonates. MBPHA was shown to possess immunomodulatory activity. Thus, when introduced to animals, MBPHA caused inhibition

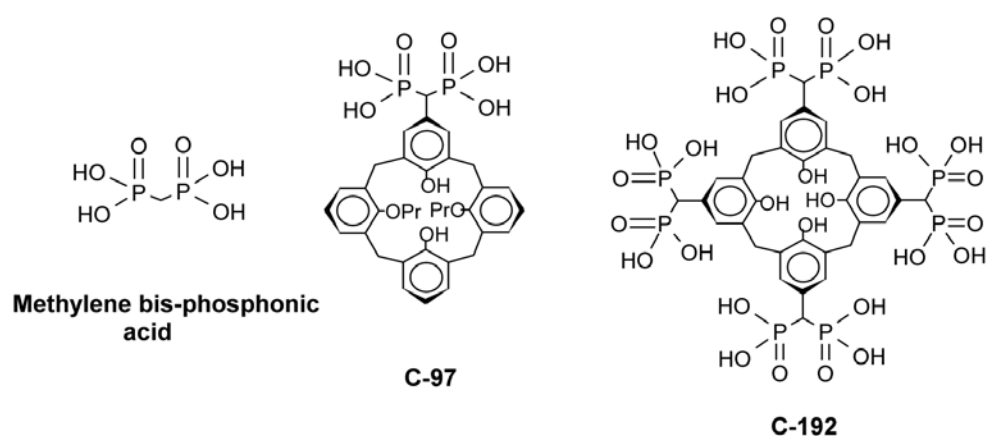


Fig. 2. Molecular structures of methylene bisphosphonic acid, calixarene methylene bisphosphonic acid C-97 and calixarene tetrakis-methylene bisphosphonic acid C-192

of both biosynthesis of antibodies to T-dependent antigens and cell immune response reactions. It also inhibited biosynthesis of IgM-, IgE- and, especially, IgG-class antibodies but did not influence the composition of lymphocyte subpopulation. Other examined bisphosphonates (oxy- and aminoderivatives of MBPHA) were strong complex forming substances but did not possess immunomodulatory effect. MBPHA and its analogs – oxyethylidene bisphosphonic acid, amino-MBPHA and phosphonoacetic acid – showed no toxicity and did not inhibit lymphocyte proliferation in culture when stimulated by mitogens. MBPHA did not essentially influence synthesis of specific interleukins by lymphocytes. It could not go through placental barrier and showed no embryo toxic effect. Use of ^{14}C -MBPHA made it possible to reveal MBPHA tropism towards lymphoid cells and determine kinetic and thermodynamic parameters of MBPHA transport into cells. The data obtained suggest that MBPHA could penetrate into lymphocytes with a transporter through the concentration gradient by means of the facilitated diffusion mechanism. Such transport may be competitively inhibited by PP_i and oxyethylidene bisphosphonic acid (but no P_i) and does not depend on the intensity of ATP synthesis in the cell. There were calculated and determined types of structural complexes that contain bisphosphonates inside cells and analyzed complexes with biologically important metals, which may interact with cell enzymatic systems [17].

Substances, which differed in a number of phosphoryl groups, type of bonds (P–C, P–O or P–N) or charge and molecular size, were used to study the mechanism by which bisphosphonates and phosphonates may influence the activity of a number of key enzymes responsible for transformation of PP_i or molecules including PP_i . S. Komisarenko et al. came to the conclusion that tropism for lymphocytes is the basis of immunomodulatory effects of phosphonates (first of all, MBPHA). Transport and accumulation of MBPHA in lymphocytes results in inhibition of inorganic pyrophosphatase activity and increase of local PP_i concentration; later, different ligand complexes of bisphosphonates with bivalent metal ions and with PP_i are formed and some enzymes change their activity, in particular, DNA-dependent RNA-polymerase II, enzymes of purine metabolism and so on [18].

On the basis of bisphosphonates, several prototypes of medicinal substances were developed [19–21]. Thus, a polyurethane composition was synthesized that might serve as an immobilized immunomodulator with local anti-inflammatory and immunosuppressive effects. It was shown that disodium salt of methylene bisphosphonic acid had antitumor properties, which resulted in development of a new antitumor preparation MEBIFON that was tested clinically and is currently produced in Kiev by the

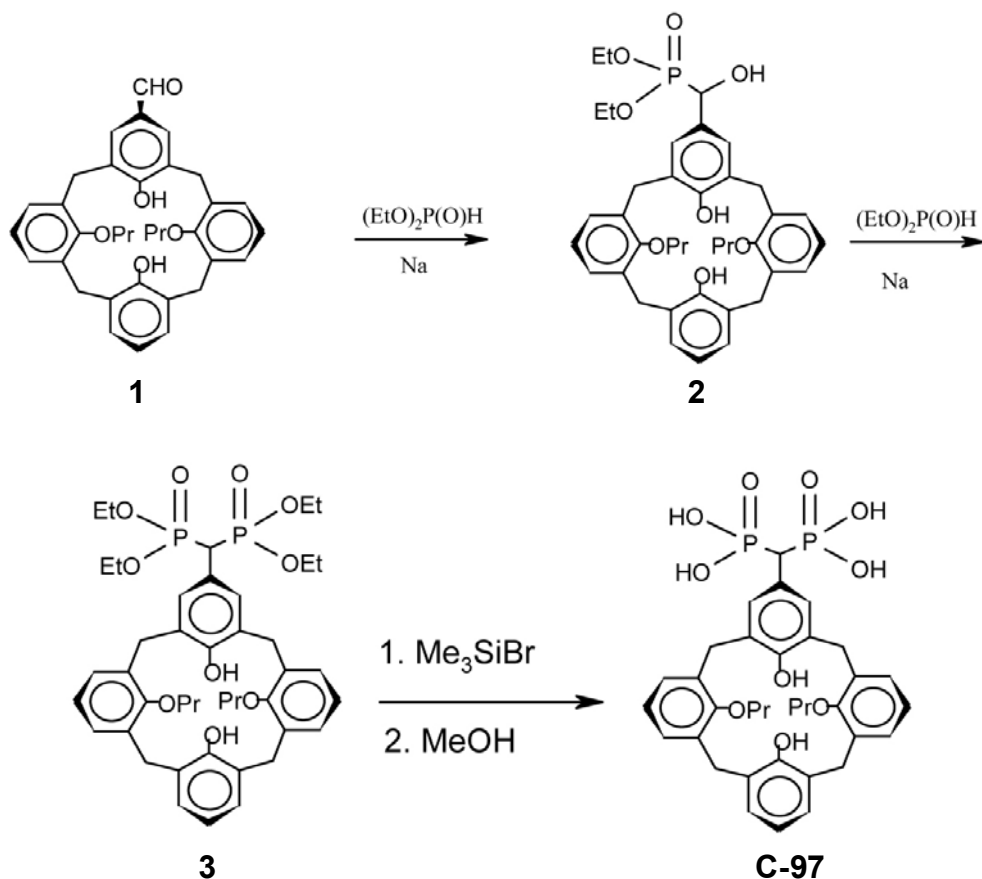
Public company FARMAK VAT. With the use of immunoglobulins (antibodies) and phosphoorganic complexons (aminobisphosphonates), there were synthesized immunovector molecules with antibody activities that conserved complex forming properties. Such structures were proposed, in particular, for radioimmunolocalisation of antigens. It should be noted that the above-mentioned investigations under the direction of S. Komisarenko were realized together with the following research workers of the Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine: N. M. Gula, G. G. Gaivoronska, M. G. Juravsky, N. P. Karlova, I. M. Kolesnikova, O. P. Penezina, G. M. Fomovska and others. Bisphosphonate and phosphonate preparations were synthesized in the Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine by A. M. Borisevich with the participation of professors P. S. Pelkis and M. O. Losinsky and in the Engelgardt Institute of Molecular Biology, AS of the USSR by N. B. Tarusova with the participation of P. M. Khomutov, the corresponding member of AS of the USSR. Synthesis of the polyurethane composition was realized together with a group of scientists from the Institute of High-Molecular Compounds Chemistry, NAS of Ukraine under the guidance of D.Sc. G. O. Pkhakadze.

This article describes the results of joint project of the Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine and the Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine focused on the synthesis, elucidation of biological activity and biopharmaceutical application of the calixarenes C-97 and C-192 functionalized with one or four biophoric methylene bisphosphonic acid groups in the upper rim (Fig. 2).

I. Synthesis and molecular structure of calixarene methylene bisphosphonic acids

The main method for synthesis of methylene bisphosphonic acids consists in using Arbuzov reaction of geminal dihalogenoalkanes with trialkyl phosphites followed by hydrolysis of the esters formed [1]. However, at synthesis of the calixarene methylene bisphosphonic acids, this method is limited by availability of appropriate dihalogenoalkyl calixarenes.

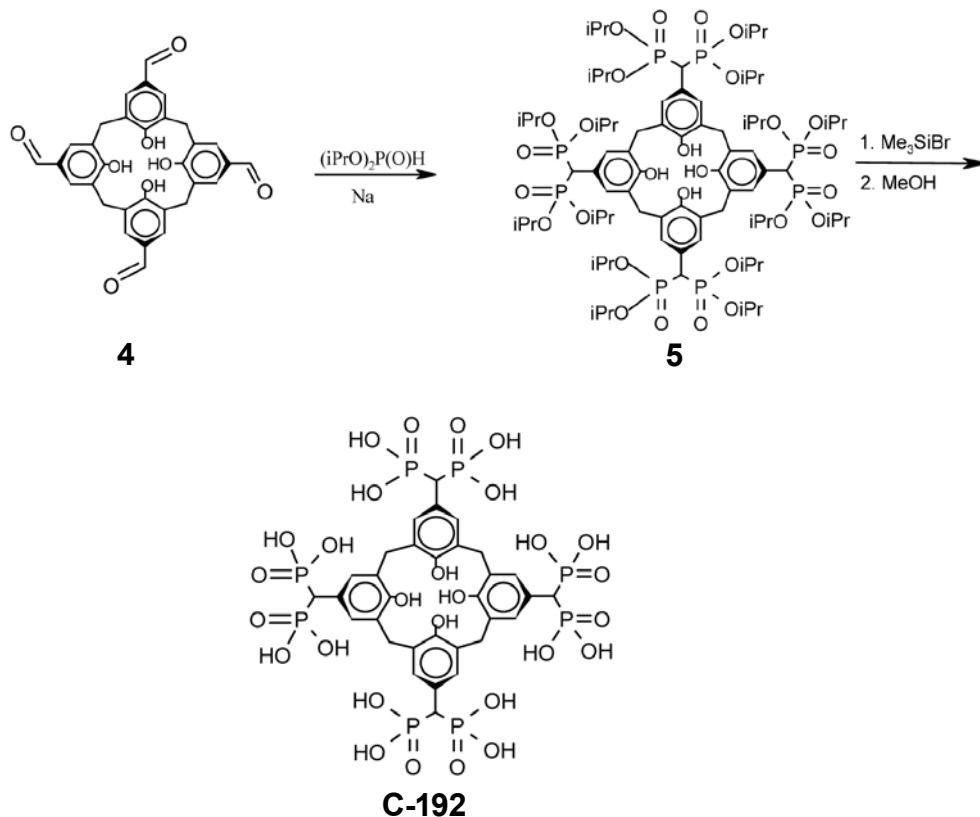
Calixarene methylene bisphosphonic acids **C-97** [23] is synthesized from monoformyl calixarene **1** (Scheme 1). On the first stage, diethylphosphite sodium salt is added to the C=O bond of monoformyl calixarene **1**, according to the classical scheme of the Abramov reaction, with formation of α -hydroxyphosphonate **2**. Then, in the presence of sodium, hydroxyphosphonate **2** diethyl phosphite cleaves water molecule to form a phosphorylated quinonmethide as intermediate (omitted in the scheme). The quinonmethide further reacts with diethyl phosphite to form calixarene methylene bisphosphonate **3**. Acid **C-97** is obtained by consecutive treatment of the ester **3** with trimethylbromosilane and methanol.



Scheme 1

Calixarene tetrakis-methylene-bisphosphonic acid **C-192** is synthesized by the reaction of tetraformylcalixarene **4** with sodium salt of diisopropyl phosphite with formation of tetrakis-bisphosphonate **5**, which after subsequent dealkylation due to treatment with trimethylbromosilane and methanol gives **C-192** (Scheme 2) [2].

According to the ^1H NMR spectra and molecular modeling data, the acids **C-97** and **C-192** adopt the *cone* conformations. The both conformations are stabilized by intramolecular hydrogen bonds $\text{OH}\cdots\text{O}$ at the lower rim of macrocycle. The conformation of **C-192** is additionally stabilized by the intramolecular hydrogen bonds between distal dihydroxyphosphoryl groups of the upper rim (Fig. 3). The upper rim bonding makes the *cone* **C-192** more regular compared with **C-97** one.



Scheme 2

Below, as examples of biological activity of calixarenes, we describe our own transdisciplinary investigations, which illustrate the use of calixarene methylene bisphosphonic acids (calix[4]arenes C-97 and C-192) as inhibitors of two separate biochemical processes: the reaction of Mg^{2+} -dependent ATP hydrolysis, catalyzed by uterine smooth muscle myosin sudfragment-1, and the process of fibrin polymerization and formation of fibrin network of thrombus.

II. Structure-functional basis of intermolecular interactions of calixarene methylene bisphosphonic acid C-97 with myometrium myosin subfragment-1

It is of importance to understand molecular and membrane mechanisms that control the contractile function of smooth muscle, in particular myometrium, in normal state and at pathological states with different disorders; therefore, investigation of these questions is rather actual. The main

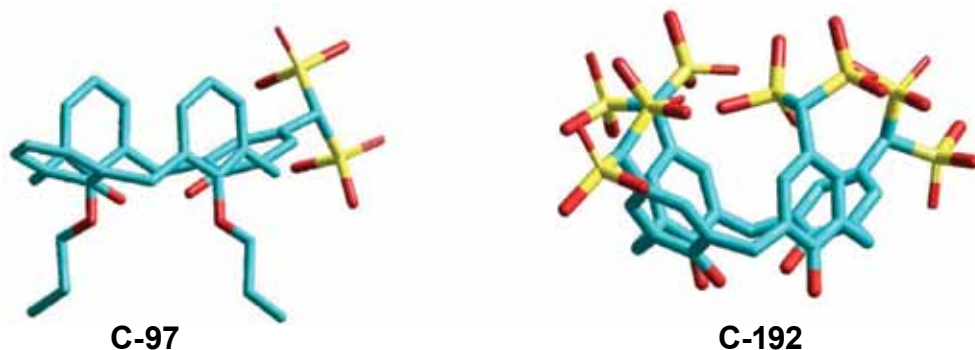


Fig.3. Energy minimized conformations of the calixarenes C-97 and C-192

function of uterus in the female organism is baby carrying and delivery. Disturbance of uterine smooth muscle motility in females often leads to various pathologies – weak labour of childbirth, premature childbirth, miscarriage etc. In this connection, there is need for development of effective methods of correcting disturbed contractile activity of myometrium and, particularly, for investigations aimed at developing and examining new pharmacological highly efficient substances capable of normalizing uterine motility.

It should be noted that at present research workers of the Department of Muscle Biochemistry (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine) and the Department of Phosphorane Chemistry (Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine) have accumulated a number of interesting experimental results concerning the influence of calixarenes on transport and enzymatic activity of membrane-associated energy-dependent cation-transporting systems of plasmatic membrane, sarcoplasmic reticulum and mitochondria of uterine myocytes. It was shown that some calix[4]arenes may serve as rather selective and high-affinity inhibitors of Mg^{2+} , ATP-dependent sodium pump (calix[4]arenes C-97, C-99 and C-107; $I_{0.5} < 100$ nM) and calcium pump (calix[4]arene C-90; $I_{0.5} = 20$ – 30 μM) in the plasma membrane with Ca^{2+} -accumulation in mitochondria, which is impossible in the presence of protonofore CCCP (calix[4]arene C-91) (here codes are given for calixarene compounds). Such membrane-associated energy-dependent transport systems are directly involved in the control of intracellular cation homeostasis (first of all, Ca^{2+} homeostasis). Nevertheless, in case of muscles, in particular smooth ones, of great importance for maintaining processes of electro- and pharmacomechanical coupling is functioning of both cation transporting ATP-dependent systems and ATP-hydrolase systems of contractile proteins. Different pathologi-

cal states of the female reproductive system (including the ones caused by hormonal disbalance) may lead to dysfunction of the uterine contractile complex, which is revealed in abnormal superprecipitation (*in vitro*) and changes of actomyosin ATPase activity. At some pathologies (e.g., hypertrophy) with disordered contractile function of smooth muscles, including myometrium, some changes may take place in the expression of myosin isoforms and kinetics of actin-myosin interaction. Accordingly, screening of reversible affine effectors of actin-myosin interaction (inhibitors, activators) is important for developing new pharmacological preparations capable of normalizing uterine contractile function at pathological state of myometrium.

Myosin ATPase transforms chemical energy, stored in ATP macroergic bonds, into mechanical work that is accompanied by directed movement; that is why this enzyme is also called a molecular motor [25]. Myosin subfragment-1 (head, S1) is N-terminal part of myosin heavy chain and consists of two domains: N-terminal globular motor (catalytic) domain, which contains an active center of ATPase, and a site of actin binding, and regulatory domain or lever-arm that is responsible for movement of myosin relative to actin.

The following functional sub-domains were identified in the structure of myosin S1: 7-stranded β -sheet (amino acid residues 116–127, 170–180, 248–257, 265–271, 458–468 and 671–678), switch 2 helix (amino acid residues 469–509), converter (amino acid residues 716–772) and SH2/SH1 hinge (amino acid residues 688–715); these sub-domains undergo substantial conformational changes during energy transfer from ATP-hydrolase centre to actin binding site [26].

ATP-binding site contains the sequence GLY-GLU-SER-GLY-ALA-GLY-LYS-THR similar to sequences in active centers of other ATPases [27]. ATPase active site is formed in part by the P-loop, Switch 1 and Switch 2 polypeptides that are linked to the 7-stranded β -sheet; conformations of these structures are sensitive to the position and coordination of γ -phosphate. ATPase center has been identified as a pocket, from which a gap is stretched to the actin binding site. When ATP binds to the myosin S1, the pocket becomes closed while the gap expands and disturbs the binding of S1 with actin; as a result, myosin subfragment-1 dissociates from actin. When ATP is hydrolyzed by myosin ATPase to ADP and P_i , actin can again associate with S1, which facilitates releasing of ATP hydrolysis products from the active center. When ATP is hydrolyzed, the presence of associated actin is important for releasing of inorganic phosphate from the nucleotide-binding pocket, since in its absence, the salt bridge between Arg₂₃₈ (switch 1) and Glu₄₅₉ (switch 2) inhibits the phosphate release [14, 28]. Switch 2 α -helix transmits linear force (arising at ATP hydrolysis)

from the active site to the converter domain; the last converts linear force into a torque that rotates the lever-arm and enables the shift of myosin relative to actin.

According to available literature, subfragment-1 is a self-sufficient functional part of myosin molecule; it preserves the properties of native myosin even in isolated state – that is, it displays ATPase activity and ability to interact with actin [29, 30].

Earlier we showed the inhibiting effect of calix[4]arene C-97 on ATPase activity of myometrium actomyosin (inhibition coefficient $I_{0.5} = 84 \pm 2 \mu\text{M}$) [31]. In this connection, the question arises concerning the mechanisms of calix[4]arene C-97 effect on ATP-hydrolase activity of (exactly) myosin subfragment-1. Subfragment-1 is a convenient model for studying calixarene effects due to its high solubility in aqueous solutions with low ionic strength (unlike myosin) and because its specific ATPase activity is close to the myosin activity.

Below we provide some data obtained in the study of calix[4]arene C-97 effect on ATP-ase activity of myometrium smooth muscle myosin subfragment-1 and consider possible mechanisms of complex formation between this calix[4]arene and myosin subfragment-1 (with the use of computer simulation techniques – docking analysis and molecular dynamics).

At first, we will give some information concerning methodological approaches used in the study.

Obtaining actomyosin and myometrium myosin subfragment-1. These studies were performed by R. D. Labintseva and O. A. Bevza (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine). Smooth muscle actomyosin was purified from muscle tissue of pig uterus according to Barany [32] and Weber [33] with some modifications. Myometrium smooth muscle myosin subfragment-1 was obtained through actomyosin splitting by α -chymotrypsin according to the method of Weeds and Taylor [34] with some modifications. Separation and purification of subfragment-1 was performed by ion exchange chromatography using column packed with DEAE-Sepharose CL-6B and chromatographic system BioRad (USA). Protein concentration was determined by Bradford method [35]; also, concentrational dependence of light absorption at 280 nm was used with the curve standardized by serum albumin. Purity of smooth muscle myosin subfragment-1 was controlled by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulphate according to Laemmli electrophoretic technique [36]. In accord with electrophoretic data, myosin head had $M_r \approx 100$ kDa, which corresponded to literature results [37]. Subfragment-1 was identified as a fraction having a rather high ATPase activity – $68 \pm 9 \mu\text{mol P}_i/\text{min}$ per 1mg of protein ($M \pm m, n = 8$).

Determination of ATPase activity of myometrium myosin subfragment-1.

These experiments were done by R. D. Labintseva and O. A. Bevza (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine). ATPase activity of myosin subfragment-1 was measured at 37 °C in an incubation medium (total volume 1 ml) of the following composition (in mM): tris-HCl buffer (pH 7.2) – 20, KCl – 100, CaCl₂ – 0.01, MgCl₂ – 5, ATP – 3 (standard conditions). The quantity of inorganic phosphate P_i removed from ATP during hydrolase reaction was determined by Chen's method [38].

Study of calix[4]arene C-97 effect on ATPase activity of myometrium myosin subfragment-1. Kinetic measurements. These experiments were carried out by R. D. Labintseva, O. A. Bevza and S. O. Kosterin (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine). To study calixarene C-97 effect on ATP-ase activity of isolated myosin subfragment-1, aliquots of calixarene solution in 50 mM tris-HCl buffer (pH 7.2) with the initial concentration 10 mM were added to the standard incubation medium (see above). Final calixarene concentration in the sample was 10–100 μM. The value of ATP hydrolase activity, determined at the absence of calixarene in the incubation medium, was taken for 100% (“zero point”). At studying concentration dependence of calix[4]arene C-97 effect on the enzymatic activity of myosin subfragment-1 ATPase, the values of the apparent inhibition coefficient $I_{0.5}$ and Hill coefficient n_H were calculated with the use of linearized Hill graphs [39] according to the empirical equation

$$\lg[(V_0 - V)/V] = -n_H \cdot \lg I_{0.5} + n_H \cdot \lg I,$$

where V is specific enzymatic activity, V_0 is specific enzymatic activity at the absence of the inhibitor in the incubation medium and I is the inhibitor concentration in the incubation medium. Typical value of the correlation coefficient r was 0.97-0.99.

Photon-correlation spectroscopy experiments. This research was carried out by O. Yu. Chunikhin, R. D. Labintseva and O. A. Bevza (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine). Photon-correlation spectroscopy (PCS) experiments were performed on the device ZetaSizer-3 Malvern Instrument (Great Britain) equipped with the Multi computing correlator type 7032 ce. Samples were irradiated by the helium-neon laser LGN-111 ($\lambda = 633$ nm, power 25 mw) and laser radiation scattered at the angle 90° was registered. Computer program PCS-Size mode v.1.61 [40] was used to analyze the experimentally measured autocorrelation function and calculate the function of distribution by hydrodynamic diameter (HDD) for microparticles in the volume of the measuring cell. PCS was used to determine average HDD and the function of distribution by dimensions for particles of myometrium myosin subfragment-1 as well as for particles that

are formed at interaction of myosin subfragment-1 with calix[4]arene C-97 (20, 60 та 100 μM).

Computer simulation of the ligand-receptor interaction in the system “calix[4]arene C-97 – myosin subfragment-1”. These experiments were carried out by O. V. Bevza, R. D. Labintseva and O. A. Bevza (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine). Computer simulation of the ligand-receptor interaction for the system “calix[4]arene C-97 – myosin subfragment-1” was performed using the software MVD 4.1.0. This program allowed realizing several algorithms of searching for the optimal ligand position in the active site of the protein (a variant of the evolutionary algorithm was used) [41]. Actually, docking of the ligand (calix[4]-arene C-97) into the ligand-binding site (LBS) of myosin subfragment-1 was realized in conditions of entirely ionized methylene bisphosphonic fragment. Standard AMBER force field parameters were used for the metal ion (Mg^{2+}) [42]. When modeling interactions between calix[4]arene C-97 and myometrium myosin subfragment-1, we realized so called “semiflexible” docking (only ligand motility was taken into account) with selection of a series of complexes having the lowest total energy of the ligand binding. Calculation of the optimal geometry of the complexes formed and determination of energetically most advantageous spatial arrangement of calixarene in the area of myosin molecule were performed taking into account van der Waals, electrostatic and hydrophobic interactions, hydrogen bonds as well as contribution of desolvation energy. In the investigation, there has been used three dimensional structure of myosin subfragment-1 with the identifier 1B7T in RSCB Protein Data Bank [43]. Molecular dynamics of calix[4]arene C-97 interaction with LBS of myosin subfragment-1 was investigated with the use of the Gromos96 force field [44]. The protein model has been “placed” into a virtual cell in the form of cut octahedron in such a manner that spacing from the protein to the cell walls did not exceed 1.5 nm. The cell was “packed” with water molecule models (solvent) – SPC (Single Point Charge). The water molecules were partially substituted for Na and Cl ions to neutralize the system charge and simulate the physiological ionic strength (0.1 M). “Counterbalancing” of the solvent molecules was carried out during 0.5 ns with the protein atoms “attached” to their initial coordinates. The temperature and the pressure were 298 K and 1 atm, accordingly (Berendsen’s method was used) [45]. Following the solvent molecule counterbalancing, additional minimization of the system energy has been performed. Actually, MD simulation method was realized using the same parameters as at the solvent “counterbalancing” except for limiting the protein atom motility. The coordinates were recorded into the initial trajectory file every 10 picoseconds. Motility of the calix[4]arene

C-97 molecule in the course of molecular dynamics was visualized with the use of the program UCSF Chimera 1.5.3 [46].

II.1. Investigation by photon correlation spectroscopy of calix[4]arene C-97 effect on the effective hydrodynamic diameter (HDD) of isolated myosin subfragment-1

PCS method gives distribution of different molecules and supramolecular structures in solution by their sizes. To determine HDD by PCS method, Stokes-Einstein formula is used that is valid only for spherical particles [47, 48]. Therefore, molecular diameters determined by this method will be close to the real ones only for globular proteins. When a protein is far from spherical form, calculated HDD is a rather conventional value.

Myosin head, main functional unit of myosin [49], is rounded or pear-shaped [16]; therefore, the preparation of isolated myometrium myosin subfragment-1 fits rather well for studying by PCS method the effect of calix[4]arene on contractile proteins. There were determined average subfragment-1 HDD and the function of particle size distribution. Isolated myosin subfragment-1 had narrow spectrum of particles in the interval from approximately 10 to 50 nm (Fig. 4). The size of most frequently registered particles ($\approx 50\%$) was close to 20 nm. There were also present in small quantity particles with diameter close to 70 nm and particles less than 20 nm. It was shown that the average (most probable) HDD of myosin subfragment-1 was 22 ± 3 nm ($M \pm m$; $n = 15$). This value fits to the literature data [50, 51].

Concentration dependence of calix[4]arene C-97 effect on the hydrodynamic indices of myosin subfragment-1 particles showed that calix[4]arene concentrations 20 and 60 μM did not cause significant changes of myosin head HDD vs. control – only trend in HDD growth was observed. Only at calix[4]arene concentration of 100 μM , myosin head HDD reliably increased versus control: from 22 ± 3 nm (control) to 33 ± 3 nm (experiment) (Fig. 5). Control examination of calix[4]arene C-97 solution in 50 mM tris-HCl (pH 7.2) failed to discover any light scattering micro-particles.

Thus, calix[4]arene C-97 at a concentration of 100 μM caused a significant (vs. control) increase of myosin subfragment-1 HDD, which indicated the formation of a complex between calix[4]arene and myosin head.

Of interest is the fact that using photon correlation spectroscopy with other supramolecular effector (activator) of myosin subfragment-1 ATP-hydrolase (calix[4]arene C-107), we could observe time dependent changes of myosin subfragment-1 HDD (data are not given). During the first 5 min after calix[4]arene C-107 addition (60 μM), values of HDD increased from

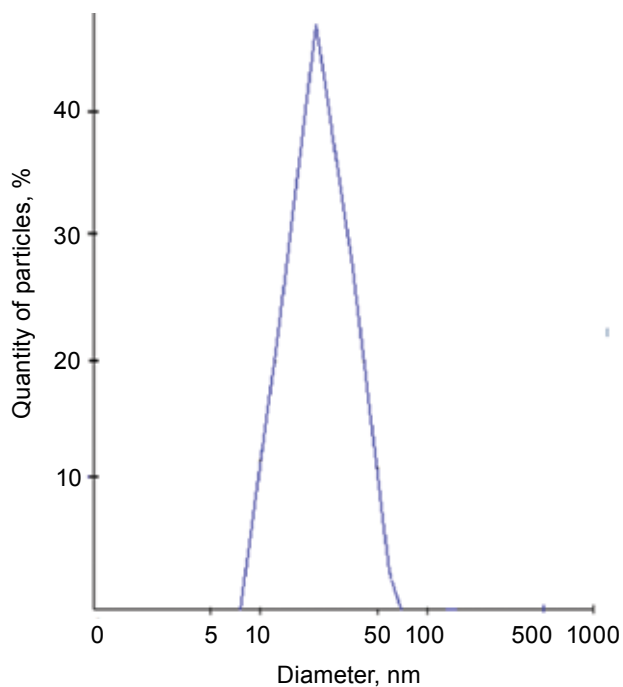


Fig. 4. The hydrodynamic diameter (HDD) distribution for myosin subfragment-1 particles. Photon-correlation spectroscopy method. The quantity of particles, equivalent HDD of which corresponded to the values in the interval from HDD_{min} to HDD_{max} with the accuracy 0.1% (according to the characteristics of the laser-correlation spectrophotometer), was taken for 100%. In the Figure, a typical experimental result is shown

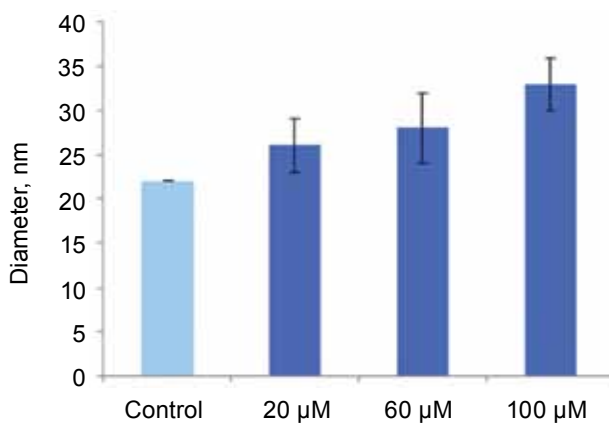


Fig. 5. Calix[4]arene C-97 increases the myosin subfragment-1 hydrodynamic diameter (HDD) ($M \pm m$; $n = 6$). Photon-correlation spectroscopy method

25 nm (control) to 70–80 nm, but the next 10 to 15 min the size of myosin head was stabilized at the HDD values of 45 nm (which is undoubtedly more vs. control).

II.2. Examination of calix[4]arene C-97 effect on ATPase activity of myometrium myosin subfragment-1

Study of calix[4]arene C-97 effect on myometrium myosin subfragment-1 ATPase showed that in concentration of 10 μM it almost did not influence ATPase activity. At further increase of this calixarene concentration, it inhibited myosin head ATPase in dose-dependent mode and at 100 μM concentration the inhibiting effect vs. control was $60 \pm 5\%$ ($M \pm m$; $n = 5$) (Fig. 6). According to the linearized graph in Hill coordinates (Fig. 6, 7), inhibition coefficient $I_{0.5} = 83 \pm 7 \mu\text{M}$ ($M \pm m$; $n = 5$).

When comparing calix[4]arene C-97 inhibition of ATPase activity for actomyosin complex ($I_{0.5} = 84 \pm 2 \mu\text{M}$) [52] and myometrium myosin subfragment-1 ($I_{0.5} = 83 \pm 7 \mu\text{M}$), one can see that myosin head and actomyosin complex display practically identical affinity towards this calix[4]arene. Of interest is the fact that Na^+ , K^+ -ATPase of plasmatic membranes [40] has several orders of magnitude higher affinity for calix[4]arene C-97 ($I_{0.5} = 98 \pm 8 \text{ nM}$) as compared with actomyosin and myosin subfragment-1 ATPase [19]. This observation should be taken into account at analysis of calix[4]arene C-97 effect on contractile and electric activity of smooth muscle cells.

Using linearized graphs at analysis of concentration dependence of subfragment-1 ATPase activity on calix[4]arene C-97, we also calculated Hill coefficient n_H , which amounts to 1.3 ± 0.5 (Fig. 7). Therefore, this value of Hill coefficient most probably suggests that myosin head may bind only one molecule of calix[4]arene C-97.

Therefore, calix[4]arene C-97 effect on ATPase of contractile complex may follow from its ability to bind with myosin subfragment-1; consequently, myosin head is supposed to be one of targets by means of which calix[4]arene C-97 may influence the contractile complex (based on the above value of Hill coefficient n_H , the stoichiometry of binding is 1 : 1).

II.3. Using the computer simulation method for examining the structural basis of molecular interactions between calix[4]arene C-97 and myometrium myosin subfragment-1

To understand the molecular mechanism of calix[4]arene C-97 inhibiting effect on myosin subfragment-1 ATPase, it needs to have information on three dimensional structure of the enzyme in complexes with substrate or/and inhibitor. With this purpose, we carried out the computer simulation for the interaction of calix[4]arene C-97 (as a separate ligand or cou-

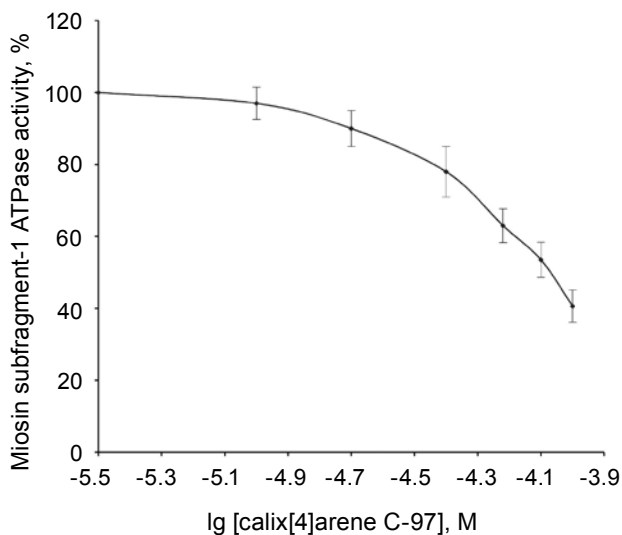


Fig. 6. Catalytic titration of myosin subfragment-1 ATPase activity with calix[4]arene C-97 ($M \pm m$; $n=5$)

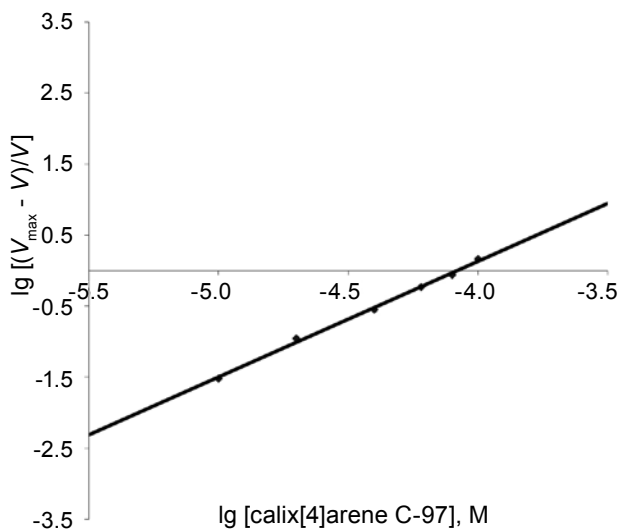


Fig. 7. Averaged curve linearized in Hill coordinates for catalytic titration of myosin subfragment-1 ATPase activity with calix[4]arene C-97

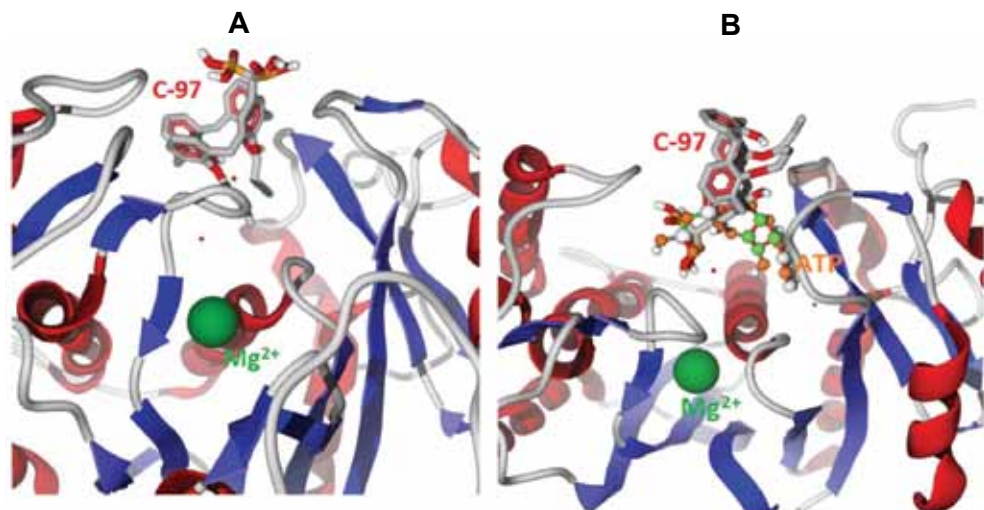


Fig. 8. Docking of calix[4]arene C-97 as a separate ligand into the active site of myosin subfragment-1 (A) and docking of the paired ligand “calix[4]arene C-97 + ATP” (B) at the presence of Mg^{2+} as a cofactor

pled with ATP) with myometrium myosin subfragment-1 at the presence of Mg^{2+} as a cofactor (Fig. 8, A, B). Mg cation takes part in binding of ATP to the active site and in the process of its hydrolysis.

An analysis of docking of calix[4]arene C-97 as a separate ligand into the ligand binding site of myosin subfragment-1 suggests that residues Asp₃₂₀, Asn₃₂₁, Leu₆₇₆ and Gln₆₇₈ may be involved in fixation of calix[4]arene phosphonate groups (the data are not shown in the Figure). Calixarene fragments are oriented in the space formed by residues Ile₃₂₂, Asn₂₃₈ and Lys₆₇₇ on one side, and by Tyr₁₂₆, Arg₁₂₇ and Arg₁₂₈ on the other. Besides, positively charged nitrogen atom of Lys₆₇₇ residue is located next to oxygen atoms of methylene bisphosphonate fragment (distance between nitrogen atom of Lys₆₇₇ residue and ionized oxygen atoms of the phosphonate group is 0.31 nm). There were identified bonds taking part in calix[4]arene binding to a site close to the active centre of myosin S-1; they are: hydrogen bonds, π - π -stacking interactions between aromatic fragments of calix[4]arene bowl and Tyr₁₂₆ of benzene ring in myosin head as well as electrostatic interactions with involvement of Arg₁₂₇, Arg₁₂₈, Asp₃₂₀ and Lys₆₇₇.

Simultaneous docking of the paired ligand “calix[4]arene C-97 + ATP” into the ligand binding centre of myosin subfragment-1 at the presence of Mg^{2+} revealed the possible formation of a complex between calix[4]arene C-97 and ATP, which binds with involvement of amino acid

residues to a site of myosin head close to the active centre; this is somewhat different from results obtained with docking of calix[4]arene C-97 alone. In addition, spatial orientation of calix[4]arene C-97 in the ligand binding centre of myosin head differs: methylene bisphosphonate fragment of calix[4]arene at its interaction with ATP molecule becomes oriented towards the active centre. Binding of the complex “calix[4]arene C-97 + ATP” to a site close to the myosin S1 active centre is realized with participation of hydrogen bonds, π - π -stacking interactions between aromatic rings of calix[4]arene bowl and benzene rings of Tyr₁₂₆ and Tyr₁₃₂ in myosin head as well as electrostatic interactions with participation of Arg₁₂₇. Residues Asn₂₃₈ and Asn₃₂₁, which are rather close to oxygen atoms of phosphonate groups, may form hydrogen bonds at interaction with ligand phosphonate groups. It is also obvious that hydrophobic platform of functionalized calix[4]arene C-97 may contribute to the binding due to the interaction with hydrophobic sites in the centre of substrate binding.

Table 1 shows amino acid residues of the active centre of myometrium myosin S1, which are involved in interactions with calix[4]arene C-97 and the complex “calix[4]arene C-97 + ATP”. According to literature, residues Tyr₁₂₆, Arg₁₂₇, Leu₆₇₆ and Lys₆₇₇, enabled in fixation of calix[4]arene C-97 phosphonate groups, are incorporated into the 7-stranded β -sheet structure of myosin subfragment-1, which is joined with polypeptide sites switch 1 and switch 2. These polypeptides participate directly in the ATPase active

Table 1. Amino acid residues of the substrate binding domain of myosin subfragment-1, which take part in binding of calix[4]arene C-97 in the case of its docking as a separate ligand and when docking is performed for a couple of ligands “C-97 + ATP” in the presence of Mg²⁺ as cofactor

C-97 + Mg ²⁺	C-97 + ATP + Mg ²⁺
Tyr ₁₂₆	Asn ₁₂₄
Arg ₁₂₇	Pro ₁₂₅
Arg ₁₂₈	Tyr ₁₂₆
Asn ₂₃₈	Arg ₁₂₇
Asp ₃₂₀	Tyr ₁₃₂
Asn ₃₂₁	Glu ₁₈₄
Ile ₃₂₂	Asn ₁₈₅
Leu ₆₇₆	Asn ₂₃₈
Lys ₆₇₇	Asn ₃₂₁
Gln ₆₇₈	Ile ₃₂₂

centre formation [14]. Therefore, it is obvious that interaction of calix[4]-arene C-97 with myosin subfragment-1 in the site located near the ATPase centre of myosin will influence this centre conformation and, accordingly, the process of ATP hydrolysis catalyzed by myosin subfragment-1.

Therefore, the results obtained by the method of molecular docking indicate that: 1) calix[4]-arene C-97 may bind with myosin subfragment-1 to the site close to the active centre, which leads to conformational changes in the last; 2) this calix[4]-arene may form a complex with ATP prior to the interaction with the protein, which complicate access of nucleoside triphosphate to the ATP binding site. It may well be that both these variants of calix[4]arene C-97 interaction with subfragment-1 may cause their inhibiting effect on ATPase activity of myometrium myosin subfragment-1. Nevertheless, it should be noted that the last variant cannot explain considerable differences (almost three orders of magnitude) between affinity towards calix[4]arene C-97 for Na^+, K^+ -ATPase and myosin subfragment-1 ATPase (values of inhibition coefficient $I_{0.5}$ is equal 100 nM [29] and 80-90 μM , respectively).

Note that the docking method fails to take into account motility of myosin S1 and ligands, which may occur in real conditions. Therefore, to verify results obtained by the docking method, we investigated interaction of calix[4]arene C-97 with the ligand binding centre of myosin subfragment-1 by the method of molecular dynamics taking into consideration the motility of both the receptor (myosin subfragment-1) and the ligand.

The dynamic analysis of the calix[4]arene C-97 molecule position in the ligand binding site of myosin subfragment-1 allowed to determine time dependent deflections of the active site atoms from their initial state; this deflections were characterized by changes of distances (in nm) between calix[4]arene centre of mass and the nearest amino acid residue (Asn_{321}). Accordingly, there was plotted (at intervals of 4 ns) time dependence of C-97 position in the ligand binding site of myosin subfragment-1. Analysis of the deflections showed that initial calix[4]arene location was changing noticeably starting approximately from 1 ns: calix[4]arene conformational mobility increased and afterwards again decreased, which correlated with the change of distance between calix[4]arene and Asn_{321} centers of mass. Therefore, the interaction of calix[4]arene C-97 with myosin head is accompanied by time variation of calix[4]arene location. In the process of molecular dynamics, the total energy of the system “calix[4]arene C-97 – myosin subfragment-1” becomes somewhat lower; therefore, calix[4]arene C-97 apparently takes up a more energy advantageous position in the ligand binding site of myosin subfragment-1. It was shown that calix[4]arene C-97 molecule shifts relative to amino acid residue Asn_{320} by about 1.81 Å

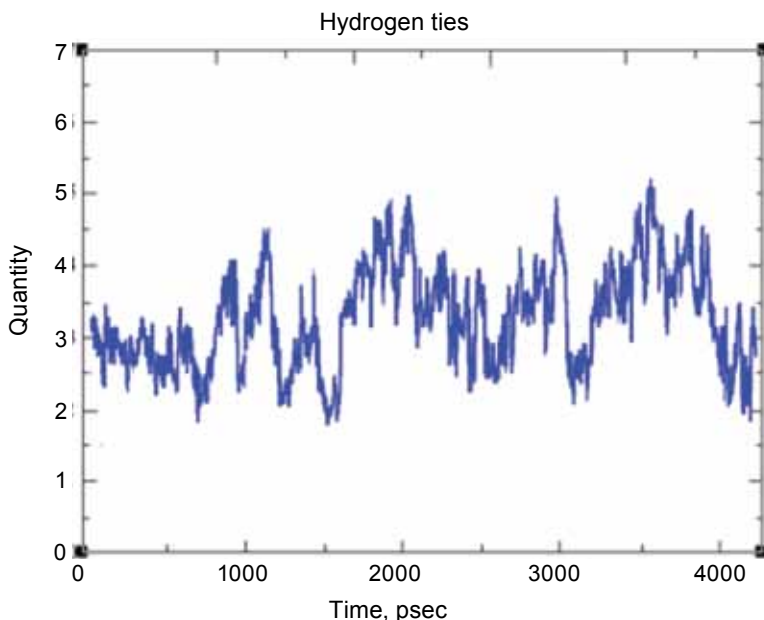


Fig. 9. Dynamics of hydrogen bonds generated between calix[4]arene C-97 and amino acid residues of the ligand binding centre of the myosin subfragment-1

and that arrangement of calix[4]arene C-97 in the final binding location is stable energetically.

The analysis of hydrogen bonds during 4 ns interval between calix[4]arene C-97 and amino acid residues of the subfragment-1 ligand binding site (Fig. 9) shows that the number of hydrogen bonds enabled in the interaction between calix[4]arene C-97 and myosin head remains on the average unchanged. Consequently, calix[4]arene location changes in the course of molecular dynamics should be most probably caused by optimization of hydrophobic and electrostatic interactions.

The method of 4 ns molecular dynamics was also used to identify amino acid residues taking part in calix[4]arene binding to the ligand binding centre of myometrium myosin subfragment-1 (Fig. 10). They include Tyr₁₂₆, Arg₁₂₇, Leu₆₇₆ and Lys₆₇₇. These residues take part in fixation of calix[4]arene phosphonate groups that are located, according to literature [14], next to the ATPase active centre. Overall, these results correlate well with the data obtained by the docking method (see above).

The computer simulation results broadened out our notions about the structural basis of intermolecular interactions between calix[4]arene C-97 and myometrium myosin subfragment-1. In particular, there was elucidated the role of hydrophobic, electrostatic and π - π -stacking interactions between

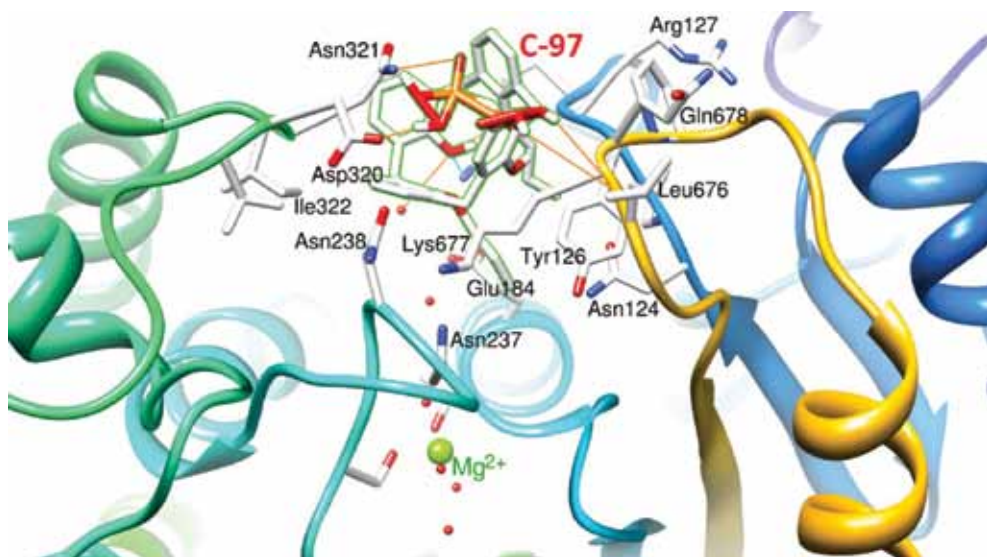


Fig. 10. Binding of calix[4]arene C-97 in the ligand binding centre of myosin subfragment-1 determined by 4 ns molecular dynamics. The Figure shows amino acid residues taking part in calix[4]arene binding to LBC of myosin subfragment-1. Dotted lines show H-bonds between amino acid residues of subfragment-1 and the inhibitor. Interactions of C-97 with myosin head include also π - π stacking interactions and electrostatic bonds

calix[4]arene and amino acid residues of myosin subfragment-1, some of which are close to ATPase active centre.

Thus, calix[4]arene C-97 inhibits effectively ATPase activity of myosin subfragment-1 ($I_{0.5} = 83 \pm 7 \mu\text{M}$). This substance causes statistically significant (vs. control) increase of the myosin head hydrodynamic diameter, which is indicative of a complex formation between calixarene and myosin head. The use of the computer simulation method resulted in identification of amino acid residues, hydrophobic and electrostatic forces that take part in interactions between calix[4]arene and myometrium myosin subfragment-1. The results obtained suggest that myosin head is one of targets for calixarene effect on contractile complex of smooth muscle.

III. Calix[4]arene methylene bisphosphonic acids as inhibitors of fibrin polymerization

The present study aimed to investigate the anticoagulant properties of phosphorus contained calix[n]arenes [24, 53] in the last two steps of blood coagulation: thrombin+fibrinogen reaction and fibrin monomer polymerization, which lead to formation of fibrin network of thrombus. Fibrinogen

is a glycoprotein (MW \approx 344 kDa) composed of two monomeric units connected by disulfide bonds. Each monomer consists of three non-identical polypeptide chains A α , B β and γ , also connected by disulfide bridges [54]. The NH₂-terminal ends of all six polypeptide chains are situated in the central region of fibrinogen known as the E-region. Two peripheral regions of the molecule historically are called the D-region.

When blood coagulation system is activated, thrombin is formed from prothrombin and attacks fibrinogen, splitting off two fibrinopeptides A (A α 1–16), and thereby exposing fibrin polymerization sites ‘A’ (A α 17–19) [55]. Removal of fibrinopeptides A leads to a form of fibrinogen deemed ‘desA’, which polymerizes spontaneously to form two-molecule thick protofibrils. Removal of fibrinopeptides B (‘desAB’) encourages lateral associations that lead to fibrils [56, 57]. The fibrils continue to associate, branching and forming a 3D network: the framework of the blood thrombus [58]. It is widely accepted that the initial step of fibrin polymerization (protofibril formation) is carried out by the intermolecular pairing of ‘A’ and ‘a’ polymerization sites of fibrin monomers. Site ‘a’ is a cavity (‘hole’) that includes amino acid residues γ Gln₃₂₉, γ Asp₃₃₀, γ His₃₄₀ and γ Asp₃₆₄, and is located in the γ C-domain of the fibrinogen/fibrin molecule [59].

In particular, we have focused on compounds in which the molecular scaffold is decorated with methylene-bis-phosphonic acid groups. One of these, calix[4]arenetetrakis-methylene-bis-phosphonic acid (C-192), has four such substituent groups (Fig. 2).

The experimental data presented in the following part of the article were carried out by the research workers of the Department of Protein Structure and Function (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine) and the Department of Phosphorane Chemistry (Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine).

Preparation of fibrinogen, fibrin desAB. These studies were performed by G. K. Gogolinska and T. A. Pozniak (Koshel) (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine). Human fibrinogen was prepared by sodium sulphate precipitation from human plasma [60] DesAB fibrin monomer was prepared as described previously [61].

Turbidity analysis of fibrin polymerization. These experiments were carried out by T. A. Pozniak (Koshel), P. G. Gritsenko and E. V. Lugovskoy (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine). The effects of compounds on fibrin polymerization were studied spectrophotometrically at 350 nm as described previously [62]. The curve of increasing turbidity during fibrin clotting shows the parameters: τ , lag time, which corresponds to the time of protofibril formation; V_{\max} , maximum rate of fibrin polymerization, which was defined by graphic calculation of the angle of the tangent to the turbidity increase curve at the point of maximum steepness;

and Δh , final turbidity of fibrin clots. The polymerization of desAB fibrin was studied at its final concentration $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the polymerization medium containing 0.05 M ammonium acetate (pH 7.4) with 0.1 M NaCl and $1\cdot 10^{-4} \text{ M}$ CaCl_2 . The polymerization of fibrin formed in the fibrinogen + thrombin reaction was investigated at a final concentration of fibrinogen of $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and thrombin of $0.4 \text{ NIH units}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the same polymerization medium.

Electron microscopy. These experiments were done by T. A. Pozniak (Koshel), P. G. Gritsenko and V. I. Chernishov (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine). The samples of polymerizing fibrin produced in the thrombin–fibrinogen reaction in the absence or the presence of calixarene C-192 (10^{-5} M) were taken out of the reaction medium at various times, placed on a carbon-coated grid for 2 min and then stained with 1% (w/v) uranyl acetate for 1 min. Transmission electron microscopy was performed with an H-600 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan) operated at 75 kV. Electron micrographs were obtained at $\times 50\,000$ magnification.

The determination of association constants by the RP-HPLC method. These experiments were done by S. O. Cherenok, O. I. Kalchenko and V. I. Kalchenko (Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine). The HPLC consisted of a high-pressure pump (type HPP 4001) (Laboratorni Pstroje, Prague, Czech Republic) connected to a Rheodyne sample 7120 injector (Rheodyne, Berkeley, CA, USA) and an ultraviolet-visible detector (type LCD 2563) (Laboratorni Pstroje). The column ($150\cdot 3.3 \text{ mm}$ inner diameter) was packed with Separon SGX CN (Lachema, Prague, Czech Republic). The mobile phase was a mixture of methanol–water in the ratio 50 : 50 (v/v), with the calixarene C-192 additive at a concentration in the range $1.48\cdot 10^{-4}$ to $5\cdot 10^{-4} \text{ M}$. The flow rate was $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The concentration of the guests/analytes in solution for analysis was 10^{-5} M . The solvent was identical to the mobile phase composition. The amount of the sample injected was $0.5 \mu\text{L}$. Each of the samples was analyzed five times. All chromatograms were obtained at 20°C . Association constants of the calixarene complexes with amino acids Gly, Pro, Arg and tetrapeptide Gly-Pro-Arg-Pro ($280\text{--}3395 \text{ M}^{-1}$) were calculated from the dependence of the $1/k'$ value versus the calixarene concentration [CA] in the mobile phase by Eqn (1) (Table 2):

$$K_A = \frac{k'_0(1/k' - 1/k'_0)}{[\text{CA}]}$$

Where k'_0 and k' are the capacity factors determined in the absence and presence of the calixarene in the mobile phase and [CA] is the calixarene concentration in the mobile phase.

Table 2. Concentration values of compounds that cause 50% inhibition of the maximum rate of the polymerization of fibrin produced in the fibrinogen + thrombin reaction

Compound	IC ₅₀ , M
C-192	1.26×10 ⁻⁶
C-98	1.31×10 ⁻⁴
1. <i>para</i> -hydroxyphenyl-methylene-bis-phosphonic acid	> 1.0×10 ⁻⁴
2. methylene-bis-phosphonic acid	0.72×10 ⁻⁴

PT and APTT assays. These experiments were carried out by T. A. Pozniak (Koshel) and P. G. Gritsenko (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine). The effects of calixarene C-192 on the coagulation of human blood plasma were studied using a coagulometer (CT 2410 'Solar', Minsk, Belarus). Reagents from Renam (Moscow, Russia) were used to calculate PT and APTT. PT and APTT ratios were calculated using the formula: t_c/t_o , where t_o is the time of clot formation in blood plasma without calixarene C-192 and t_c is the time of clot formation in blood plasma with calixarene C-192.

Calix[4]arene methylenebisphosphonic acids as inhibitors of fibrin polymerization

C-192 was studied with respect to its effects on fibrin polymerization in two kinds of assay. In the first assay, the formation of fibrin was followed directly after the addition of thrombin. In the second assay, previously prepared fibrin was dispersed and then allowed to repolymerize under appropriate conditions. In both cases, fibrin formation was gauged by turbidity measurements. Turbidity analysis showed that the compound decreased the maximum rate of fibrin polymerization in the thrombin–fibrinogen reaction by 50% at a molar ratio of compound to starting fibrinogen of 1.7 : 1 (Fig. 11). The final turbidity of clots was decreased by 50% at a molar ratio of 4.3 : 1 (compound : starting fibrinogen) (Fig. 11, C). The lag-time was also increased strongly in the presence of C-192, indicating either an decrease of the rate of protofibril formation or, conceivably, an increase of protofibril critical length (Fig. 11, B). Similar results were obtained when calixarene C-192 inhibited the re-association of dispersed desAB fibrin (Fig. 12, A–C); in this case, IC₅₀ = 1.26·10⁻⁶ M.

Such a strong and specific inhibition by calixarene C-192 of both the thrombin–fibrinogen reaction and the re-association of fibrin desAB indicates that calixarene retards clotting not as a result of the inhibition

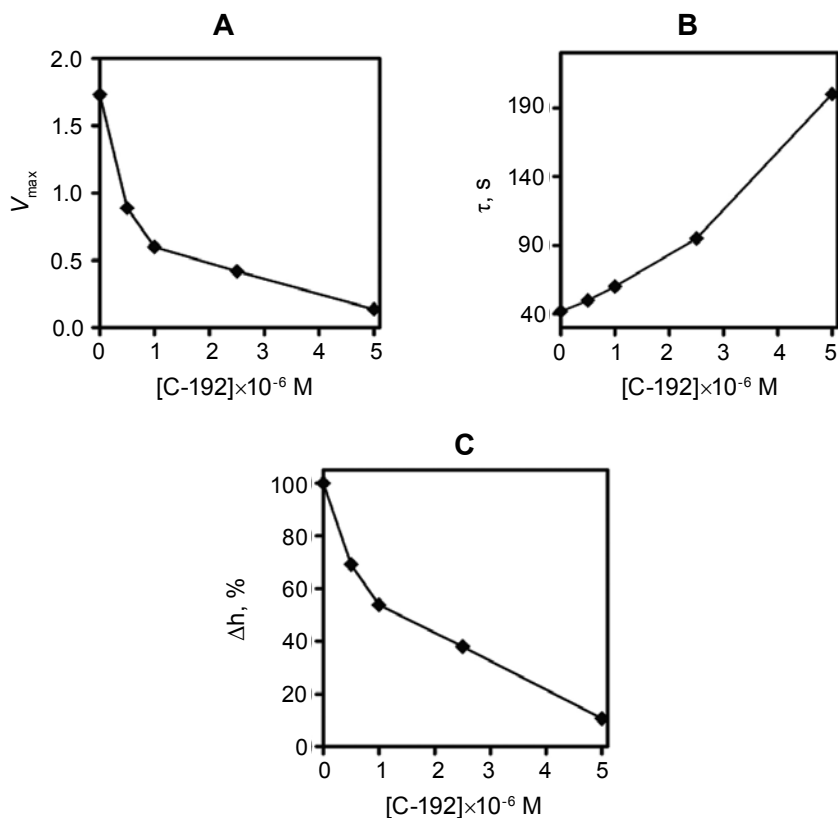


Fig. 11. Turbidity analysis of the influence of C-192 on fibrin polymerization in the fibrinogen + thrombin reaction. The dependence on calixarene C-192 concentration is shown for (A) the maximum rate of fibrin polymerization V_{max} , (B) the lag-time τ and (C) the final turbidity of fibrin clots Δh

of thrombin, but entirely because of the blocking of fibrin polymerization sites.

We also performed electron microscopy studies to determine the stage of fibrin polymerization that was inhibited by C-192. Transmission electron microscopy of the thrombin + fibrinogen media showed that fibrin remained in monomer state in the presence of calixarene C-192 at its final concentration of 10⁻⁵ M, whereas, at the same time, mature fibrils were formed in the absence of C-192 (Fig. 13).

The results of turbidity analysis and electron microscopy indicate that the inhibition by C-192 occurs at the first stage of fibrin polymerization, presumably by blocking one of the sites of protofibril formation.

We also investigated the inhibitory effects of two structural fragments of C-192: *para*-hydroxyphenyl-methylene-bis-phosphonic acid (1) and

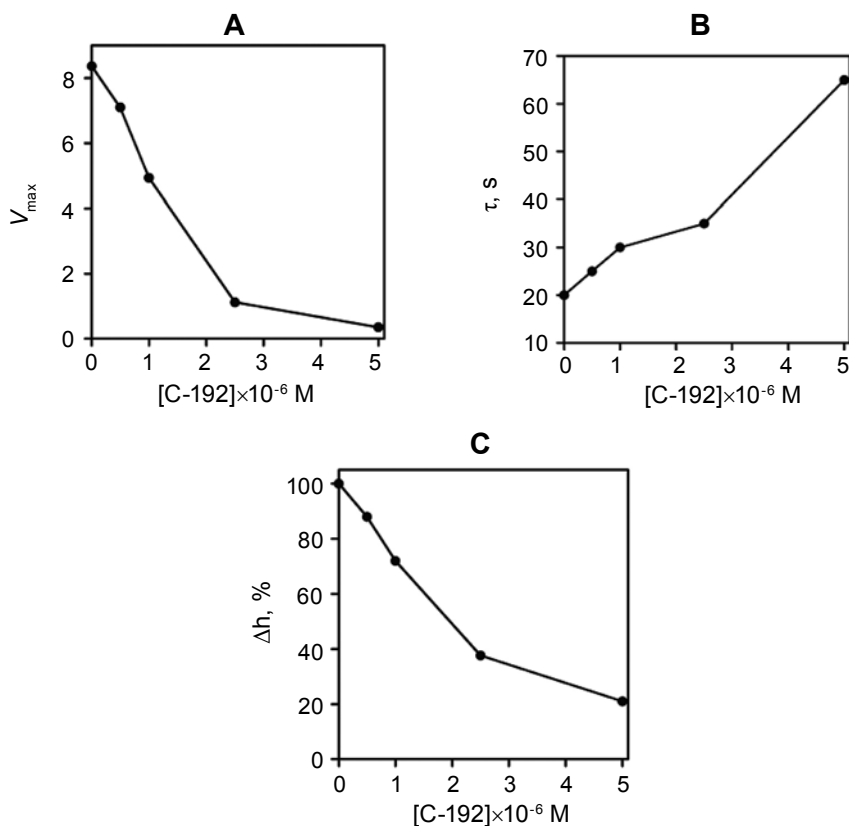


Fig. 12. Turbidity analysis of the influence of C-192 on fibrin desAB polymerization. The dependence on calixarene C-192 concentration is shown for (A) the maximum rate of fibrin polymerization V_{\max} , (B) the lag-time τ and (C) the final turbidity of fibrin clots Δh

methylene-bis-phosphonic acid (2) (Fig. 14). The results showed that these constituents inhibit fibrin polymerization with considerably less activity: the IC_{50} value was $> 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ for 1 and $0.72 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ for 2.

It is of interest that the inhibitory activity of C-98, which has the two methylene-bis-phosphonic acid substituents, is much less (Table 2) ($IC_{50} = 1.31 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, indicating that the calixarene scaffold and the number of phosphoryl groups in the molecule play a crucial role in the inhibitory effect.

Furthermore, calixarene C-192 doubles both the prothrombin time (PT) and APTT in normal human blood plasma at concentrations of $7.13 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ and $1.10 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, respectively (Fig. 15). The molar ratios of C-192 to plasma fibrinogen were approximately 21 : 1 and 3.3 : 1 for the PT and APTT assays, respectively. The delays in clotting times in the

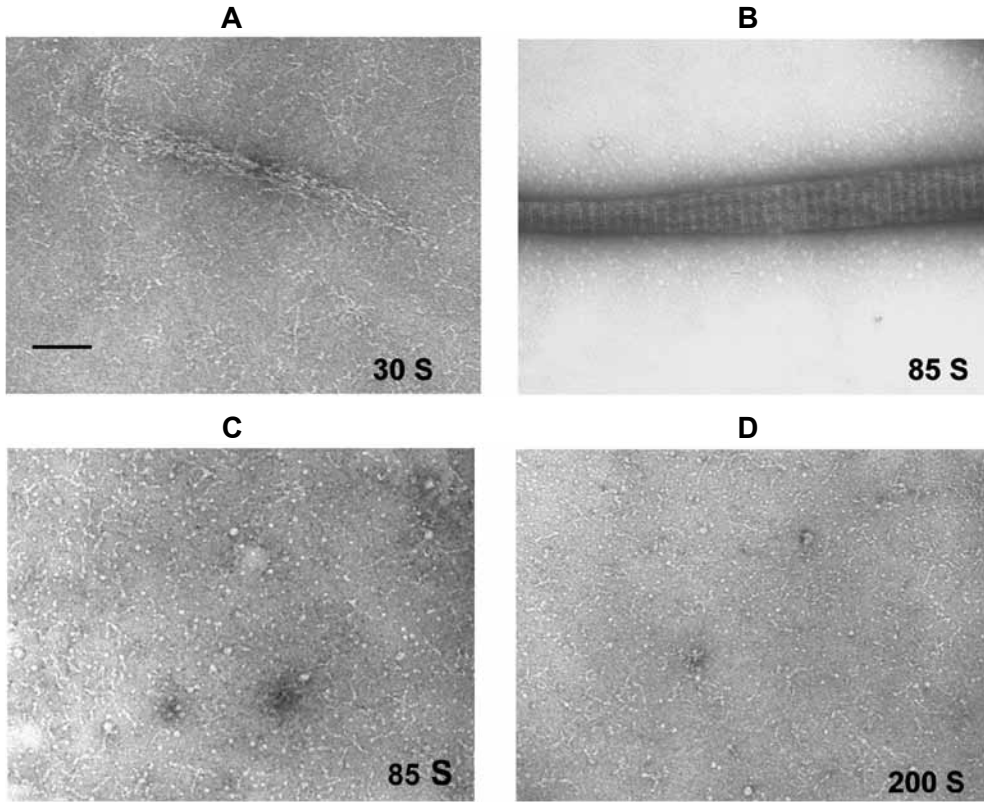


Fig. 13. Electron micrographs of fibrinogen + thrombin reaction media in the absence of C-192 (A, B), as well as in its presence (C, D). Scale bar = 100 nm

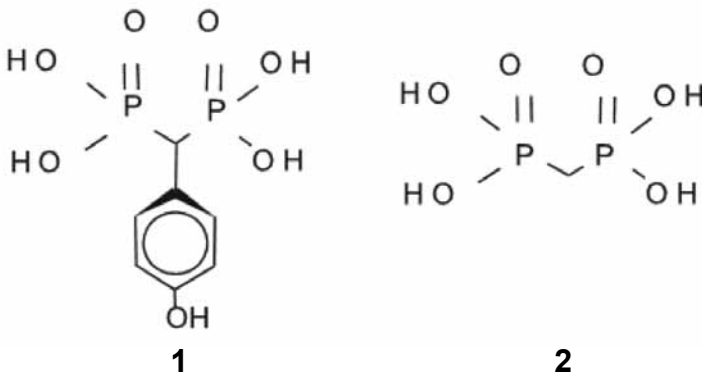


Fig. 14. Two structural fragments of C-192: *para*-hydroxyphenyl-methylene-bis-phosphonic acid (1) and methylene-bis-phosphonic acid (2)

blood plasma coagulation experiments are what would be expected by the inhibition of the fibrin polymerization from fibrinogen after the activation of the blood coagulation system. Electron microscopy confirmed that C-192 inhibits the first stage of fibrin polymerization (i.e. the formation of protofibrils).

Because this stage is fulfilled through the intermolecular binding of the complementary sites 'A'-'a', it appeared to be certain that this inhibition is a result of the blocking of site 'A' (Aa17-19, GlyProArg) by the calixarene in a 'knob-hole' manner. To confirm that this was the case, we employed HPLC to study complex formation between C-192 and the synthetic peptide Gly-Pro-Arg-Pro, a synthetic analogue of the A knob; the free amino acids Gly, Pro and Arg were used as controls. Association constants of calixarene C-192 complexes with amino acids Gly, Pro, Arg and tetrapeptide Gly-Pro-Arg-Pro in methanol-water mobile phase (50 : 50, v/v) were determined as previously described [17, 18]. The addition of calixarene C-192 to the mobile phase decreased the capacity factor, k' , of the guest molecules (Table 3). This confirms the formation of inclusion host-guest complexes. There is linear dependence of $1/k'$ versus the concentration of C-192 in the mobile phase (Fig. 16); the correlation coefficient is 0.98-0.99, indicating a 1 : 1 ratio of calixarene to Gly-Pro-Arg-Pro in the complex.

In accordance with the molecular modelling data (Fig. 17, A, B), there are two modes of C-192-Gly-Pro-Arg-Pro complexation. In the first mode (A), cooperative electrostatic interactions of two proximal negatively-charged phosphonyl groups with the Gly α -amino terminal group and the Arg guanidinium residue play a principal role in complex formation. Most of the tetrapeptide molecule is exposed outside the calixarene cavity. In the second mode (B), the hydrophobic part of Gly-Pro-Arg-Pro molecule is deeply embedded into the calixarene cavity. The complex is stabilized by P-O...H₃N⁺ electrostatic interactions of the phosphonyl group with the

Table 3. Values $1/k'$ of the guests and association constants K_A (M^{-1}) for their complexes with calixarene C-192. RSD, relative standard deviation

Guest	Calixarene concentration					K_A , M^{-1} (RSD, %)
	0.0	1.48	2.52	3.54	5.00	
	$1/k'$					
Gly	0.302	0.313	0.324	0.331	0.349	280 (10)
Pro	0.294	0.318	0.367	0.396	0.403	814 (26)
Arg	0.311	0.395	0.532	0.592	0.794	2576 (21)
Gly-Pro-Arg-Pro	1.287	1.754	2.453	3.015	3.693	3395 (19)

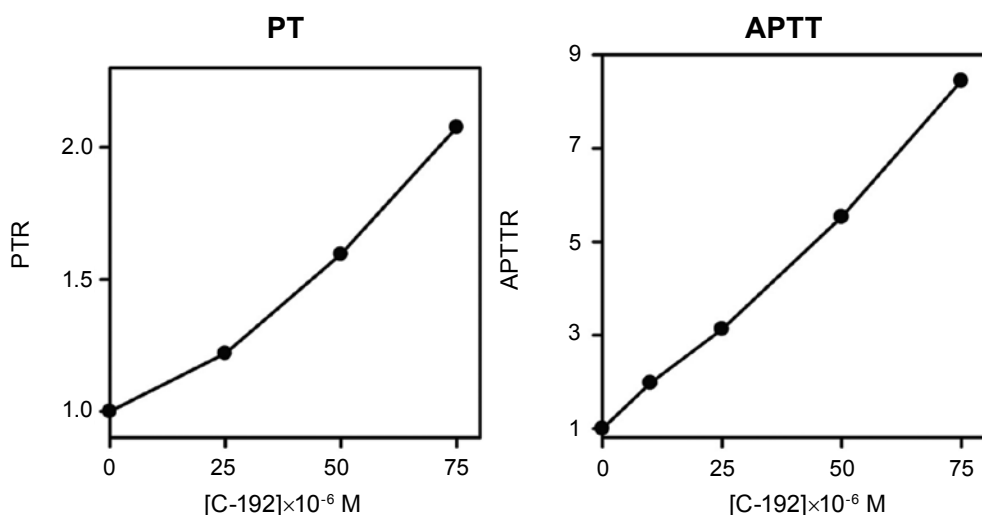


Fig. 15. The dependence of the PT and APTT ratios on the calixarene C-192 concentration

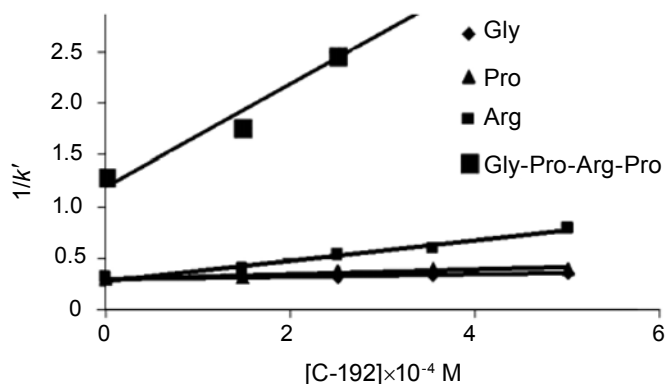


Fig. 16. Dependence of $1/k'$ for Gly, Pro, Arg and Gly-Pro-Arg-Pro on the C-192 concentration in the mobile phase

Gly amino acid residue, as well as by CH- π interactions of CH₂-group in the Pro residue with the calixarene aromatic ring. Hydrophobic forces can additionally stabilize the complex in a water solution.

Thus, we have shown for the first time that C-192 is a powerful and specific inhibitor of the final step of blood coagulation, fibrin polymerization, and can be used as the basis for the design of new class of anti-thrombotic agents. We found that the mechanism of C-192 inhibition

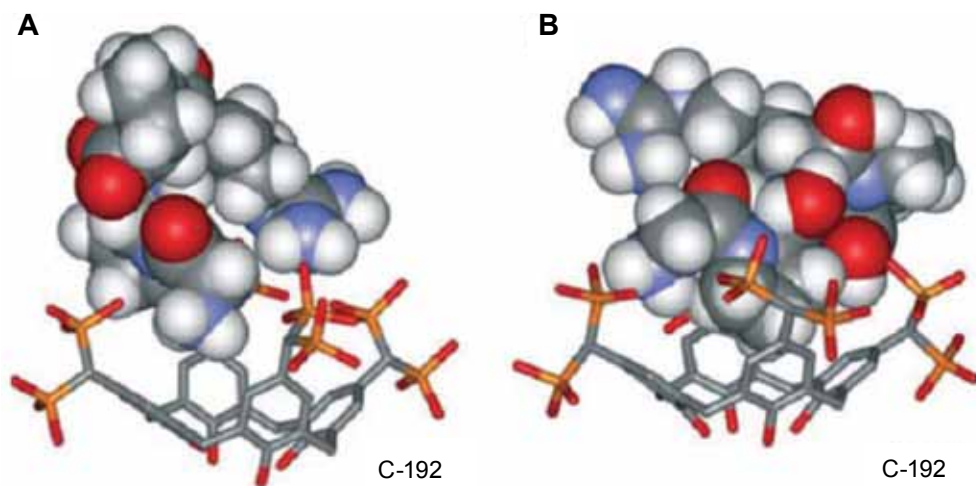


Fig. 17. Two modes of energy minimized structures of calixarene C-192 complexed with GlyProArgPro. (A) Cooperative electrostatic interactions of two proximal negatively charged phosphonyl groups of C-192 molecule with Gly- α -amino terminal group and Arg guanidinium residue. (B) The hydrophobic part of GlyProArgPro molecule is embedded into the calixarene cavity

involves its effect on the first step of fibrin polymerization, protofibril formation, which is carried out via intermolecular interactions of complementary polymerization sites 'A' and 'a' of fibrin molecules.

We have also shown that C-192 forms complex with synthetic peptide Gly-Pro-Arg-Pro, which imitates polymerization site 'A' (Aa17 Gly-Pro-Arg), suggesting that the inhibitory effect of C-192 may be a result of the blocking of site 'A' by this calixarene.

The previous scientific experiments with healthy adult mice have shown that the calixarene C-192 is median toxic compound (LD_{50} is 780 mg/kg, *perorally*).

These experiments demonstrate that calix[4]-arene C-192 (calixarene tetrakis-methylene bisphosphonic acid) is a specific inhibitor of fibrin polymerization and blood coagulation can be used for the design of a new class of antithrombotic agents.

We believe that our data make a contribution to modern knowledge about biochemical and biophysical properties of calixarenes and the molecular mechanism of their interactions with proteins. Taking into account the ability of calixarenes to penetrate into the cell and their low toxicity, these data may be used as a basis for the further development of a new generation of the supramolecular effectors for regulation of smooth muscle

contractile activity at the level of ATP dependent actin-myosin interaction and can be used for the design of a new class of antithrombotic agents.

The authors express their gratitude to R. D. Labintseva, O. A. Bevza and O. V. Bevza, T. A. Pozniak (Koshel), P. G. Gritsenko (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine) and S. O. Tcherenok, S. O. Cherenok (Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine) for their active participation in experimental investigations as well as O.Yu. Tchunikhin (Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine) for assistance in performing experiments on photon-correlation spectrophotometer and Chernishov V. I. for assistance in performing experiments on electron microscopy.

The study was realized due to financial support of the complex targeted interdisciplinary program of NAS of Ukraine for scientific researches "Fundamental grounds of molecular and cellular biotechnologies" project N13/1(4)-31/10 and "Preparation of substance for medical purpose" project N 5.16.4.37-20/10.

References

1. *Gutsche C. D.* Calixarenes: an introduction, monographs in supramolecular chemistry. – Royal Society of Chemistry. Cambridge, 2008.
2. *Calixarenes* 2001. Asfari M.-Z., Böhmer V., Harrowfield J., Vicens J. (eds.). – Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 2001.
3. *Calixarenes for Separations.* Lumetta G. J., Rogers R. D., Gopalan A.S. (eds). – American Chemical Society. Washington, 2000.
4. *Calixarenes in the Nanoworld.* Vicens J., Harrowfield J. (eds). – Springer. Dordrecht. The Netherlands, 2007.
5. *Da Silva E., Lazar A. N., Coleman A. W.* // J. Drug. Sci. Tech. – 2004. – **14**. – P. 3–20.
6. *Rodik R. V., Boyko V. I., Kalchenko V. I.* // Curr. Med. Chem. – 2009. – **16**. – P. 1630–1655.
7. *Weinstein R. S., Roberson P. K., Manolagas S. C.* // N. Engl. J. Med. – 2009. – **360**. – P. 53–62.
8. *Gnant M., Mlineritsch B., Schippinger W.* // N. Engl. J. Med. – 2009. – **360**. – P. 679–691.
9. *Gulaya N. M., Komisarenko S. V.* / Uspekhi biologicheskoy Khimii. – M.: Nauka, 1982. – **22**. – C. 195–213.
10. *Komisarenko S. V., Karlova N. P., Kolesnikova I. N. et al.* // Chemistry and biology of immunoregulators: [Collected papers] / Acad. Sci. Latv. SSR, Inst. org. Synthesis; [Editorial board: G. I. Chipens (editor-in-chief) et al.]. – Riga: Zinante, 1985. – P. 237–252.
11. *Komisarenko S. V., Gulaya N. M., Borisenro A. M., Veller O. S.* // Reports Acad. Sci. USSR. – 1979. – P. 563–566.
12. *Komisarenko S. V., Kolesnikova I. N., Fomovskaya G. N.* // Ukr. Biokhim. Zhurn. – 1985. – **57**. – P. 62–66.

13. *Komisarenko S. V., Fomovskaya G. N., Kolesnikova I. N. et al.* // Ukr. Biokhim. Zhurn. – 1985. – **57**. – P. 56–61.
14. *Fomovskaya G. N., Komisarenko S. V.* // Biokhimiya. – 1985. – **50**. – P. 839–843.
15. *Gaivoronskaya G. G., Komisarenko S. V.* // Ukr. Biokhim. Zhurn. – 1983. – **55**. – P. 403–407.
16. *Smirnova I. N., Kudryavtseva N. A., Komissarenko S. V. et al.* // Arch. Biochem. Biophys. – 1988. – **267**. – P. 280–284.
17. *Karlova N. P., Komissarenko S. V.* // Reports Acad. Sci. USSR. – 1981. – P. 68–70.
18. *Gulaya N. M., Bogomolets E. O., Karlova N. P., Komissarenko S. V.* // Farmakologia i toksikologia. – 1980. – **XLIII**. – P. 192–195.
19. *Gaivoronskaya G. G., Strelchuk S. I., Komissarenko S. V.* // Tsitologia i genetika. – 1981. – **15**. – P. 41–45.
20. *Fomovskaya G. N., Komissarenko S. V.* // Chemistry of tumors in USSR. – 1987. – Issue 48: Materials of III All-Union meeting «Actual problems of experimental chemotherapy of tumors», Chernogolovka, November, 1987. – P. 14–16.
21. *Sharykina N. I., Kudriavtseva I. G., Komissarenko S. V., Karlova N. P.* // Chemistry of tumors in USSR. – 1987. – Issue 48: Materials of III All-Union meeting «Actual problems of experimental chemotherapy of tumors», Chernogolovka, November, 1987. – P. 12–13.
22. *Curry J. D., Nicholson D. A., Quimby O. T.* // Top. Phosphorus Chem. – 1972. – **7**. – P. 37–102.
23. *Vovk A. I., Kalchenko V. I., Cherenok S. O. et al.* // Org. Biomol. Chem. – 2004. – **2**. – P. 3162–3166.
24. *Lugovskoy E. V., Gritsenko P. G., Koshel T. A. et al.* // FEBS J. – 2011. – **278**. – P. 1244–1251.
25. *Khataee H. R., Khataee. A. R.* // Digest J. Nanomater. Biostruct. – 2009. – **4**. – P. 613–621.
26. *Burghardt T. P., Neff K. L., Wieben E. D. et al.* // BMC Genomics. – 2010. – **11**. – P. 172. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/172>.
27. *Bárány M., Bárány K.* Biochemistry of Smooth Muscle Contraction / Ed. Bárány M. – Chicago: Academic Press. – 1996. – 418 p.
28. *Kaliman I. A., Grigorenko B. L., Shadrina M. S., Nemukhin A. V.* // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2009. – **11**. – P. 4804–4807.
29. *Popov E. M., Demin V. V., Shibanova E. D.* Problem of protein. – 2: Three-dimensional structure of protein / Edited by T. I. Sorokina. – M: Nauka, 1996. – 480 p.
30. *Levitsky D. I.* // Biokhimiya. – 2004. – **69**. – P. 1447–1462.
31. *Bevza A. A., Labintseva R. D., Rodik R. V. et al.* // Ukr. Biokhim. Zhurn. – 2009. – **81**. – P. 49–58.
32. *Bárány M., Bárány K., Gaetijens M., Balin G.* // Arch. Biochem. Biophys. – 1966. – **113**. – P. 205–211.
33. *Weber A.* // Biochem. Biophys. Acta. – 1956. – **19**. – P. 345–351.
34. *Weeds A. G., Taylor R. S.* // Nature. – 1975. – **257**. – P. 54–56.
35. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–282.

36. Laemmly U. K. // Nature (London). – 1970. – **227**. – P. 680–685.
37. Iwane A. H., Kitamura K., Tokunaga M. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – **230**. – P. 76–80.
38. Chen P. S., Toribara Jr., T. Y., Warner H. // Analyt. Chem. – 1956. – **28**. – P. 1756–1758.
39. Kurganov V. I. Allosteric enzymes. – M.: Nauka, 1978. – 248 p.
40. Merkus H. G. Particle Size Measurements. Fundamentals, Practice, Quality. – Springer. – 2009. – 533 p.
41. Storn R. M., Price K. // J. Glob. Optim. – 1997. – P. 341–359.
42. Case D. A., Pearlman J. A., Caldwell J. W. et al. / AMBER 7. University of California, San Francisco. – 2002. – 318 p.
43. Berman H. M., Westbrook J., Feng Z. et al. // Nucl. Acids Res. – 2000. – **28**. – P. 235–242.
44. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B. et al. // J. Comput. Chem. – 2005. – **26**. – P. 1701–1719.
45. Allen M. P., Tildesley D. J. / Computer Simulation of Liquids. Oxford: Clarendon Press. – 2002. – 385 p.
46. Li L., Jose J., Xiang Y., Kuhn R. J., Rossmann M. G. // Nature. – 2010. – **468**. – P. 645–646.
47. Korostylev P. P. / Preparing solutions for chemico-analytical researches. Publishers Acad. Sci USSR. – 1964. – 310 p.
48. Burgess S. A., Yu S., Walker M. L. et al. // J. Mol. Biol. – 2007. – **372**. – P. 1165–1178.
49. Proteins and Cell Regulation. Myosins. A Superfamily of Molecular Motors / Ed. Coluccio L. M. – Watertown, MA, USA.: Springer. – 2008. – **7**. – 467 p.
50. Baby G. J., Warsaw D. M., Periasamy M. // Microsc. Res. Tech. – 2000. – **50**. – P. 532–540.
51. Burgess S. A., Yu S., Walker M. L. et al. // J. Mol. Biol. – 2007. – **372**. – P. 1165–1178.
52. Veklich T. O., Kosterin S. A., Rodik R. V. et al. // Ukr. Biokhim. Zhurn. – 2006. – **78**. – P. 70–78.
53. Cherenok S. O., Yuschenko O. A., Gritsenko P. G. et al. Synthesis of calixarene-methylenebisphosphonic acids and their influence on fibrin polymerization // Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem. – 2011. – **186**. – P. 964–965.
54. Blomback B. Fibrinogen and fibrin – proteins with complex roles in haemostasis and thrombosis // Thromb. Res. – 1996. – **83**. – P. 1–75.
55. Laudano A. P., Doolittle R. F. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1978. – **75**. – P. 3085–3089.
56. Fowler W. E., Hantgan R. R., Hermans J., Erickson H. P. Structure of the fibrin protofibril // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1981. – **78**. – P. 4872–4876.
57. Weisel J. W., Veklich Y., Gorkun O. The sequence of cleavage of fibrinopeptides from fibrinogen is important for protofibril formation and enhancement of lateral aggregation in fibrin clots // J. Mol. Biol. – 1993. – **232**. – P. 285–297.
58. Weisel J. W. Fibrin assembly. Lateral aggregation and the role of the two pairs of fibrinopeptides // Biophys. J. – 1986. – **50**. – P. 1079–1093.

59. *Spraggon G., Everse S. J., Doolittle R. F.* Crystal structures of fragment D from human fibrinogen and its crosslinked counterpart from fibrin // *Nature*. – 1997. – **389**. – P. 455–462.
60. *Varetskaya T. V.* Microheterogeneity of fibrinogen. Cryofibrinogen // *Ukr. Biokhim. Zhurn.* – 1960. – **32**. – P. 13–24.
61. *Belitser V. A., Varetskaja T. V., Malneva G. V.* Fibrinogen-fibrin interaction // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1968. – **154**. – P. 376.
62. *Lugovskoi E. V., Makogonenko E. M., Chudnovets V. S. et al.* The study of fibrin polymerization with monoclonal antibodies // *Biomed. Sci.* – 1991. – **2**. – P. 249–296.

SOME RECENT FINDINGS IN THE BIOTECHNOLOGY OF BIOLOGICALLY IMPORTANT NUCLEOSIDES

Igor A. MIKHAILOPULO¹, Anatoly I. MIROSHNIKOV²

¹*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus;
e-mail: imikhailopulo@gmail.com;*

²*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;
e-mail: aim@ibch.ru*

Some recent findings in the biotechnology of biologically important nucleosides will be discussed, viz., (i) a new strategy of the cascade one-pot transformation of D-pentoses into nucleosides based on the extension of knowledge of the mechanism of functioning of the ribokinase (RK), phosphopentomutase (PPM), and uridine (UP), thymidine (TP) & purine nucleoside (PNP) phosphorylases, and the role of different factors (structural, electronic, stereochemical) in the glycoside bond formation, (ii) the modern chemistries of the chemo-enzymatic syntheses of nucleosides, (iii) the transglycosylation reaction using natural and sugar modified nucleosides as donors of carbohydrate residues and heterocyclic bases as acceptors catalyzed by nucleoside phosphorylases (NP).

Nucleosides embrace a large family of natural and chemically modified analogues of great structural diversity and a broad spectrum of biological activity. Analogues of natural nucleosides as well as nucleoside antibiotics belong to the most important classes of antiviral drugs, and they are extensively used in the treatment of a variety of cancers. Base and sugar modified nucleosides are very valuable constituents of artificial oligonucleotides of medicinal potential making these oligomers more stable in biological fluids and improving their targeting properties. The chemistry of many antiviral and anticancer drugs, as well as building blocks for oligonucleotide synthesis remains a challenging problem resulting in a high price of the desired compounds preventing them from extensive therapeutic application and use in oligonucleotide business (for a recent reviews, see [1–3]).

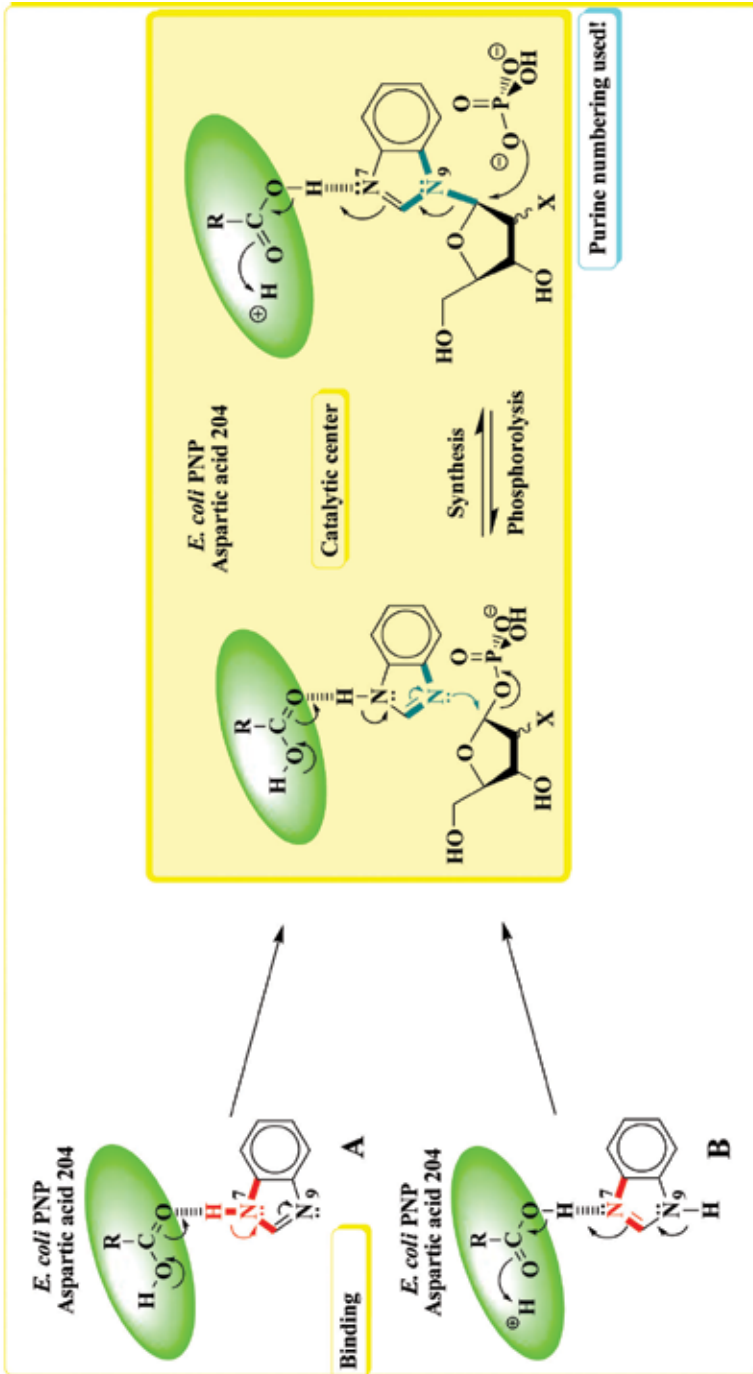
An analysis of the state of the art of chemo-enzymatic synthesis of nucleosides led us to conclusion that the chemo-enzymatic methodology demonstrates a number of advantages over the chemical methods of nucleoside synthesis, viz., high total yield of desired products, simplicity of work-up of reaction mixtures and isolation of products, conform to the principles of “green chemistry” to a greater extent vs. the fine organic synthesis [1–3]. Up to the present, the vast majority of the modified nucleo-

sides have been synthesized by chemical methods. Despite the impressive progress achieved in the development of chemical methods, production of many antiviral and anticancer drugs, as well as other biologically active compounds remains a challenge. This leads to high drug costs and, therefore, prevents extensive biological trials and studies, as well as wide therapeutic application. The need for the development of new strategies became apparent in the late 1970's.

The chemo-enzymatic (biotechnological) strategies are currently displacing multistage chemical processes, and this allows performing the key transformations with high selectivity and *regio*- and *stereo*-specificity. Considerable progress in the production of biologically important analogs of natural nucleosides has been achieved through the rational combination of chemical and biochemical transformations. The use of recombinant nucleoside phosphorylases (NPs) and *N*-deoxyribosyl transferases (NDTs) as biocatalysts for the synthesis of natural nucleosides and their modified analogs is of considerable importance for the creation of modern technological processes. Noteworthy that both groups of enzymes complement one another and allow finding out a straightforward route to the desired compound. The use of the chemo-enzymatic methods allows undoubtedly improve the price-quality ratio in the production of many medical drugs.

The possible areas of application of nucleoside phosphorylases for the synthesis of nucleosides, as well as the limitations of this methodology, have been investigated in detail; however, several very interesting enzymatic synthetic reactions deserve special attention because they are crucial for understanding the mechanism of synthetic reactions catalyzed by these enzymes and may expand the scope of their practical use. It is well documented that the *N*⁷-atom of purines plays a very important role in the phosphorolytic cleavage of the glycosyl bond of purine nucleosides and, it seems, in the reversed synthetic reaction catalyzed by *E. coli* purine nucleoside phosphorylase (PNP; product of *deoD* gene; EC 2.4.2.1) as well, even though the mechanism of this reaction has not been adequately studied. The finding that 3-deazapurines and 1-deaza-, 3-deaza- and 1,3-dideazapurines (benzimidazoles, including fluoro-, chloro- and bromo-substituted) are good substrates for PNP allows to suggest a key role for two nitrogen atoms of the imidazole ring in the synthetic reaction (for a discussion, see [1]). Namely, one of them is involved in the binding of the heterocyclic base in the enzyme's active site that may lead to an increase of the nucleophilicity of the second nitrogen atom. This facilitates, in turn, an attack by this atom on the electrophilic C1 carbon atom of α -D-pentofuranose-1-phosphate and eventually results in the formation of a glycosidic bond (Scheme 1) [2].

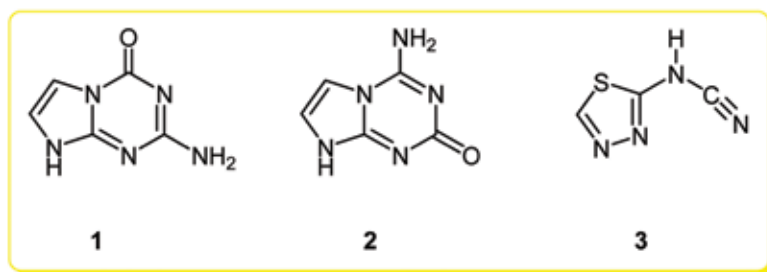
The mechanism of the synthetic reaction catalyzed by nucleoside phosphorylases in general and PNP in particular remains unclear. The



Scheme 1

participation of two nitrogen atoms of benzimidazole in this reaction seems to be obvious albeit there are two modes **A** and **B** of initial binding of the substrate. The Check authors studied substrate properties of a number of purine heterocyclic bases and their aza- and deaza-analogues using partially purified *E. coli* PNP and gel-entrapped cells of an auxotrophic thymine-dependent strain of *E. coli* as a biocatalyst for the transfer of the 2'-deoxy-D-ribofuranosyl moiety of 2'-deoxyuridine to bases. The reactions proceeded *regio*- and *stereo*-specifically affording purine nucleosides as well as 8-aza-2'-deoxyadenosine and 8-aza-2'-deoxyguanosine but no substrate activity of 7-deazapurines was observed. It was thus concluded that the presence of the nitrogen-7 of purines and their isosteric analogues is a prerequisite for the reaction [4]. However, there are several exceptions, viz., 5-aza-7-deazaguanine (**1**), 5-aza-7-deazaisoguanine (**2**) and *N*-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-cyanamide (**3**) are substrates for bacterial and mammalian purine nucleoside phosphorylases (PNP's) (Scheme 2) [2].

These data imply that the mechanism of binding and activation of substrate in the catalytic center of *E. coli* PNP is not uniform and prompted



Scheme 2

us to gain insight into the functioning of the enzyme and to search for new substrates and inhibitors.

Results and Discussion

The main line of the present study based on the suggested by us new strategy of nucleoside synthesis consisting in the cascade transformation of pentoses into nucleosides through intermediate consecutive formation of pentofuranose-5-phosphate and α -D-pentofuranose-1-phosphate (PF- α 1P) catalyzed by recombinant *E. coli* ribokinase (RK), phosphopentomutase (PPM) and nucleoside (uridine, thymidine and purine nucleoside) phosphorylases (Scheme 3) [5]. Before an idea of the cascade transformation – D(L)-pentose + base \rightarrow nucleoside – was proved, the chemical synthesis

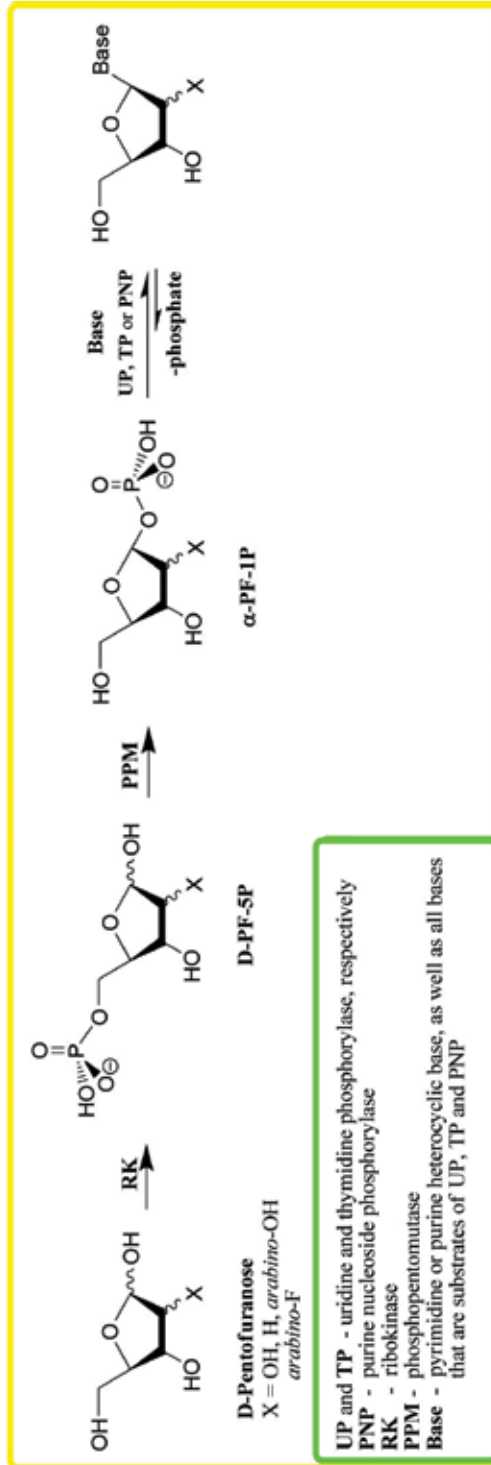
of PF- α 1P was considered as an important supplementary approach to the preparation of sugar and base modified nucleosides for biological and medicinal application. The chemo-enzymatic nucleoside synthesis consisting of the chemical preparation of PF- α 1P followed by an enzymatic condensation with heterocyclic bases seemed to be more versatile and rather attractive.

Preparation of recombinant E. coli ribokinase (RK), phosphopentomutase (PPM) and nucleoside phosphorylases (NP's) on the practical level is of utmost importance for the project and this task was realized and all these enzymes were obtained as they spend at work [2, 3, 5–7]. Taking into account the aims of the present study, the preparations of the aforementioned enzymes have been obtained in different forms [lyophilized powders of high enzymatic (>90% after 3–5 years storage at +4 °C) stability], solution of a protein in diverse buffers] and different levels of purity (carefully purified for biochemical studies; sufficient purity for biotechnological studies).

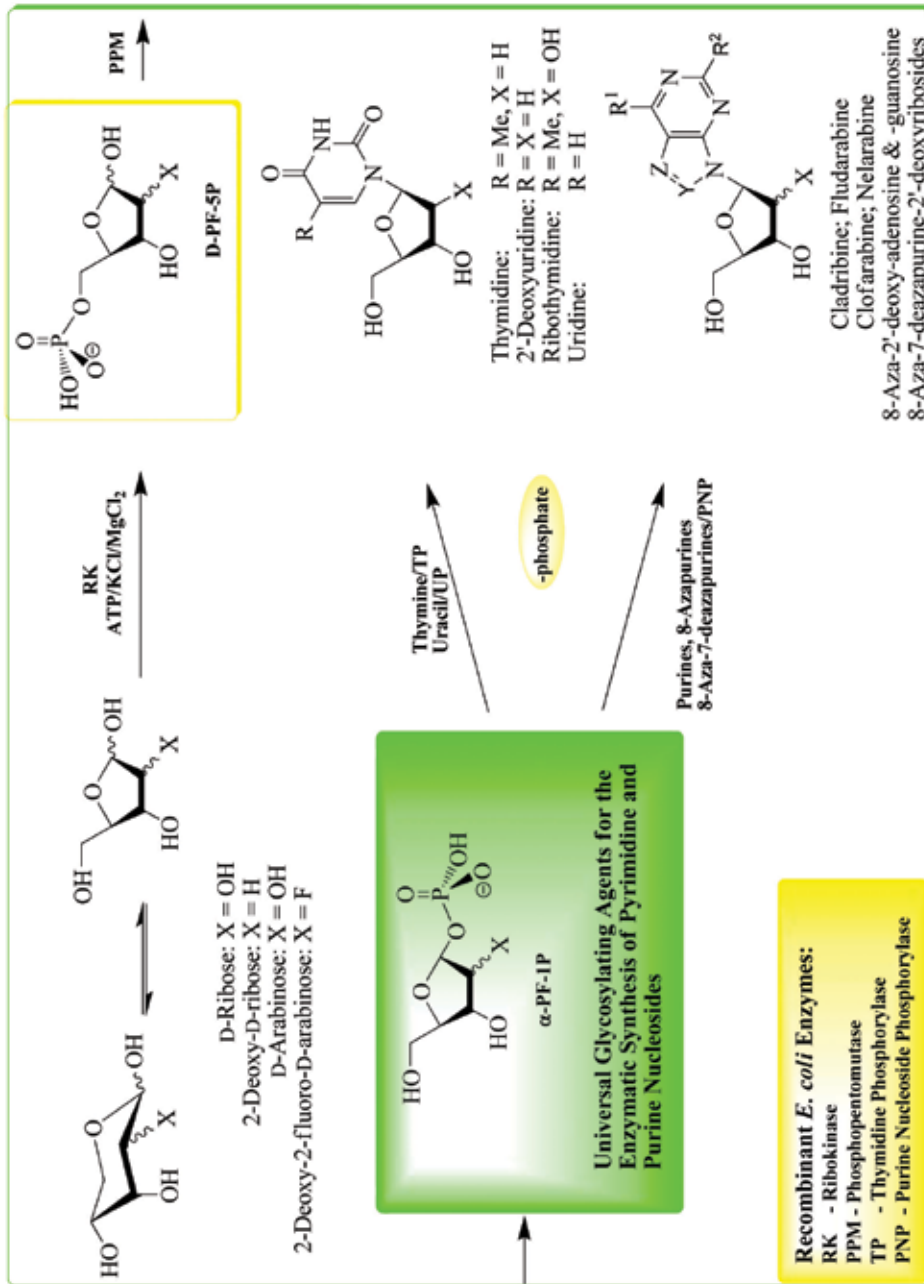
A possibility of cascade one-pot enzymatic transformation of D-ribose or 2-deoxy-D-ribose into nucleosides employing pure recombinant *E. coli* ribokinase (RK) [D-pentose \rightarrow pentose-5-phosphate (D-PF-5P)], PPM [D-PF-5P \rightarrow α -D-pentofuranose-1-phosphate (D-PF- α 1P)], and nucleoside phosphorylases (NP's) (D-PF- α 1P + heterobase \rightarrow nucleoside) coupled with the appropriate pyrimidine or purine heterobases was demonstrated (Scheme 4) [7]. Preliminary results of a cascade transformation of D-pentoses into nucleosides pointed to a reliability to develop practical methods for the preparation of antileukemic drugs (*Cladribine*, *Fludarabine*, *Clofarabine*, *Nelarabine*) and a number of biologically important nucleosides.

We noted rather essential differences between the optimal reaction conditions for RK [5], PPM [7] and recombinant *E. coli* nucleoside phosphorylases [6]. Bearing this in mind, we have optimized the one-pot reaction conditions aimed at finding out a compromised composition of the substrates allowing satisfactory function of the enzymes under investigation. It was found that D-ribose, 2-deoxy-D-ribose, D-arabinose and 2-deoxy-2-fluoro-D-arabinose are transformed into the respective nucleosides in good yields; D-xylose as well as some 2(3)-deoxyfluoro-D-pentofuranoses and L-pentofuranoses are not involved in the cascade transformation into nucleosides. This study is continued.

Our studies unambiguously showed for the first time that 1,6-diphosphates of D-hexoses are not necessary for the transformation of 5-phosphates of D-ribose, 2-deoxy-D-ribose, D-arabinose and 2-deoxy-2-fluoro-D-arabinose into the corresponding 1-phosphates. This is one of the most important findings because it essentially simplifies the application of PPM as a biocatalyst within the one-pot cascade transformation of D-pentoses into nucleosides



Scheme 3



Scheme 4

as well as for the transformation of chemically prepared 5-phosphates into intermediary 1-phosphates and then into nucleosides (Scheme 4) [7].

The strategy of cascade one-pot synthesis of nucleosides suggested by us [5, 7] is of interest for development of practical methods for the preparation of biologically important nucleosides. It should be emphasized that this strategy allows preparing β -D-ribo-, 2-deoxy- β -D-ribo-, β -D-arabino- and 2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabino-nucleosides of natural purine and pyrimidine (except for 2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabino-nucleosides) bases, as well as base modified nucleosides. Indeed, R&D of this strategy led us to the simple and efficient preparation of anti-leukemic drugs 2-chloro-2'-deoxyadenosine (*Cladribine*) from 2-deoxy-D-ribose and 2-chloroadenine, 9-(β -D-arabinofuranosyl)-2-fluoroadenine (*Fludarabine*) (D-arabinose + 2-fluoroadenine), 9-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-2-chloroadenine (*Clofarabine*) (2-deoxy-2-fluoro-D-arabinose + 2-chloroadenine) and 2-amino-9-(β -D-arabinofuranosyl)-6-methoxypurine (*Nelarabine*) (D-arabinose + 2-amino-6-methoxypurine). Moreover, preliminary results of the synthesis of a number of biologically important nucleosides [e.g., 2'-deoxyribosides of 8-azapurines and 8-aza-7-deazapurines (*vide infra*)] have validated this strategy [8].

Transfer of a pentofuranosyl moiety of commercially available nucleosides or prepared by chemical methods to purine or pyrimidine bases catalyzed by nucleoside phosphorylases (NPs) or N-deoxyribosyltransferases (DRTs) ("transglycosylation reaction") was demonstrated to be a very efficient methodology for the synthesis of a plenty of analogues of natural nucleosides of biological and medicinal importance (for recent reviews, see, e.g., [1–3]). The bacterial nucleoside phosphorylases [purine (PNP), thymidine (TP) and uridine (UP)] reversibly catalyze (i) the phosphorolysis of nucleosides with an intermediary formation of α -D-pentofuranose-1-phosphate (PF- α 1P), and (ii) the synthesis of new nucleosides in the presence of external heterocyclic bases. As distinct from nucleoside phosphorylases, DRTs catalyze the direct transfer of the 2'-deoxyribofuranosyl moiety of donors without intermediary formation of 2-deoxyribofuranose-1-phosphate. From the viewpoint of practical synthesis of sugar and base modified nucleosides, NP and DRT complement each other, but the latter have a strict specificity towards substrates thereby limiting their application.

Base halogenated nucleosides of benzimidazole attract attention of researchers since the pioneering studies by I. Tamm and his co-workers were initiated in the early 1950's of the last century (for a review, see [9]). However, the most important findings from the viewpoint of the biochemical mechanism of antiviral activity of this class modified nucleosides [10] as well as their possible practical application [11] have been published during last two decades (reviewed in [12, 13]).

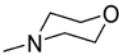
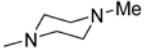
It was earlier shown that benzimidazole (BI) and its derivatives with substituents in the benzene ring are good substrates of *E. coli* PNP in the transglycosylation reaction [1, 14–7]. In the present project, we studied 5,6-difluorobenzimidazole and its derivatives, one fluorine atom of which is replaced with methoxy, ethoxy, isopropoxy, 4-morpholino and N-methylpiperazino groups, as acceptors of the D-ribofuranose and 2-deoxy-D-ribofuranose residues in the transglycosylation reaction employing uridine (Urd) and thymidine (Thd) [2'-deoxyuridine (dUrd)], respectively, as the pentofuranose donors and recombinant *E. coli* UP, TP and PNP nucleoside phosphorylases as biocatalysts [18].

The reaction transglycosylation was employed for the synthesis of the β -D-ribo- and 2-deoxy- β -D-ribonucleosides **4-15**. The reaction conditions have been optimized depending on the kind of a ribofuranose donor, the donor/base ratio, and quantity of the recombinant *E. coli* enzymes and temperature of the reaction. The use of readily available natural purine ribonucleosides as donors of the ribofuranose residue in the transglycosylation reaction of BI allows employing PNP as the sole biocatalyst. On the contrary, the use of uridine as a donor of the ribofuranose residue requires two nucleoside phosphorylases for transglycosylation reactions, viz., the recombinant *E. coli* uridine phosphorylase (UP) for the intermediary formation of α -D-ribofuranose-1-phosphate (D-Rib- α 1P) that is accepted by *E. coli* PNP for the synthesis of the BI ribosides. The efficiency of both types of donors was tested in the transglycosylation of 5,6-difluorobenzimidazole and it was found that the use of uridine and two nucleoside phosphorylases is preferable in terms of yield of the desired nucleosides.

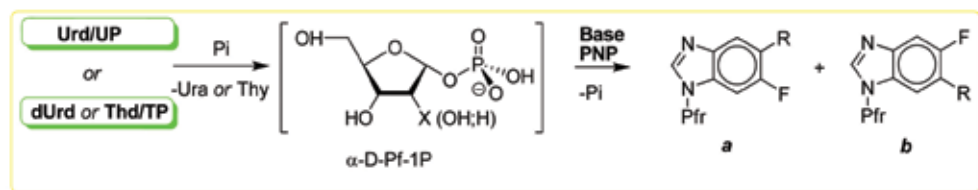
It was found that the 3 : 1 to 10 : 1 molar donor/base ratio and the use of 40 units of uridine phosphorylase (UP) per 1 mmol of uridine (60–160 UP units for 2'-deoxyuridine) and 155–400 units of PNP are necessary to obtain the ribosides **4-15** in good yields calculated for isolated products (Table 1). Reactions were conducted at 52 °C in the K,Na-phosphate buffer (5–20 mM; pH 7.0) monitoring the formation of the products by HPLC, the conversion of base into nucleoside(s) was $\geq 98.5\%$. It is noteworthy that the synthesis of 2'-deoxyribosides was completed in 1–3 h, whereas the *trans*-ribosylation proceeded much more slowly and 22–28 h required achieving high yields of the reaction products. Similar trend was earlier observed in the case of the *ribo* and 2'-*deoxyribo* nucleoside syntheses using the whole *E. coli* cells as biocatalyst (Scheme 5) [18].

Regio-isomeric structure of all isolated nucleosides was proved by scrupulous analysis of the ^1H and ^{13}C NMR spectral data (incl. [$^1\text{H}, ^1\text{H}$] & [$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$] 2D: COSY, HSQC, HMBC and NOE spectra). The predominant (OMe and OEt) or exclusive (OiPr, 4-morpholino and N-methylpiperazino) formation of the 5-substituted 6-fluoro-1-(β -D-ribofuranosyl)-

Table 1. The synthesis of benzimidazole nucleosides

Compd	Pfr *	R	Yield for isolated product (%)	Ratio of isomers	
				<i>a</i>	<i>b</i>
4	Rib	-F	77	—	
5	dRib		68	—	
6	Rib	-OMe	54	95	5
7	dRib		51	41	59
8	Rib	-OEt	98	89	11
9	dRib		85	70	30
10	Rib	-OiPr	75	100	—
11	dRib		65	96	4
12	Rib		75	100	—
13	dRib		80	100	—
14	Rib		79	100	—
15	dRib		68	100	—

* Pfr = β -D-Pentofuranosyl (Rib – β -D-ribofuranosyl; dRib – 2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl).



Scheme 5

benzimidazoles was observed. The formation of the *regio*-isomeric 5-fluoro-1-(2-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-6-methoxy(ethoxy, *i*-propoxy)benzimidazoles was observed in the *trans*-2-deoxyribosylation reaction of the corresponding bases. The predominant or exclusive formation of the *regio*-isomeric N^1 -nucleosides with bulky 5-substituents of 6-fluorobenzimidazole points to a large hydrophobic pocket in the *E. coli* PNP active site that can accommodate these groups.

During recent years, the use of *D*-pentofuranose-1-phosphates (PF-1Ps) as substrates of an enzymatic synthesis of nucleosides attracts much attention [1–3]. It should be stressed that the enzymatic and chemical syntheses of *D*-ribofuranose-1-phosphate and its 2-deoxy counterpart have rather reach

prehistory. However, only recently a few interesting reports from the point of view of the possible practical application have been published. There are two lines of investigation in this area, *viz.*, (i) biochemical (microbial, enzymatic) *retro*-synthesis of 2'-deoxyribonucleosides employing the triose phosphate isomerase (TRI) and 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA) enzymes and (ii) chemical synthesis of D-pentofuranose-1-phosphates (PF-1Ps) followed by the enzymatic condensation with heterocyclic bases.

Within this line of investigation, the laborious preparation of the α -D-pentofuranose-1-phosphates (PF- α 1Ps) is a serious bottleneck of this approach. However, despite rather complex synthesis of PF- α 1Ps this chemo-enzymatic methodology for the synthesis of biologically valuable nucleosides represents an advisable alternative to an enzymatic transfer of sugar fragment of nucleoside to heterocyclic base ("transglycosylation reaction") as well as to the microbial (enzymatic) *retro*-synthesis [1–3].

Scrutiny of the chemical methods for the preparation of pento(hexo) furanose-1-phosphates as well as different methods of activation of the anomeric carbon atom shows that most of them are laborious and low-yielding. As might be expected, the formation of anomeric mixtures was usually observed, and only tedious crystallization-induced asymmetric transformation leads to the predominant formation of the desired dRF- α 1P (reviewed in [1–3]). From the standpoint of simplicity, the method suggested by MacDonald [19] for the synthesis of pyranose-1-phosphates seems to be the most efficient one and prompted us to apply it for the synthesis of α -D-arabinofuranose-1-phosphate (**19**; Ara^F- α 1P) [20]. We focused our studies on the development of practical chemical synthesis of PF-1Ps and selected D-arabinose as a starting pentose bearing in mind that a plenty of purine and pyrimidine β -D-arabinofuranosides manifest antiviral and anticancer activities.

It is remarkable that Ara^F- α 1P synthesized by Wright & Khorana was found to be inactive as a substrate for the pyrimidine deoxyriboside phosphorylase of *E. coli* (thymidine phosphorylase, TP) and for the purine nucleoside phosphorylase (PNP) of fish muscle [21]. These data taken together prompted us to synthesize Ara^F- α 1P and to investigate its substrate properties for recombinant PNP of *E. coli*.

Treatment of the peracetyl derivative of D-arabinose **16** with anhydrous phosphoric acid under MacDonald' conditions followed by work-up gave rise to the formation of the amorphous powder or viscous oil consisting of α -D-arabinofuranose-1-phosphate (**19**; Ara^F- α 1P) and β -D-arabinopyranose-1-phosphate (**20**; Ara^P- β P) (ca. 50%, combined; the **19** : **20** ratio was from 1.5 : 8 to 1 : 2, according to ¹H NMR). The structure of both phosphates was proved by (i) the scrupulous analysis of the ¹H

and ^{13}C NMR spectra as well as $[\text{H},^1\text{H}]$ and $[\text{H},^{13}\text{C}]$ 2D spectra of the mixtures of different anomer ratio, (ii) comparison with the ^1H and ^{13}C NMR data for the related 1-phosphates, and (iii) the comparative analysis of the *ab initio* calculations of 1-phosphates of selected α -D-pentofuranoses and two conformers, ${}^1\text{C}_4$ and ${}^1\text{C}_4$, of β -D-arabinopyranose (Table 2).

In consent with experimental results, the *ab initio* calculations point to a higher stability of both possible conformers of β -D-arabinopyranose-1-phosphate, viz., ${}^1\text{C}_4$ and ${}^1\text{C}_4$, vs α -D-arabinofuranose-1-phosphate [$\Delta E = E(\text{AP-}\beta\text{1P}; {}^4\text{C}_1) - E(\text{AP-}\beta\text{1P}; {}^4\text{C}_1) = -11.7$ kcal/mol; [$\Delta E = E(\text{AP-}\beta\text{1P}; {}^4\text{C}_1) - E(\text{AF-}\alpha\text{1P}; \text{O4-}exo) = -26.9$ kcal/mol] (Table 2). It was previously shown that the ratio of α - and β -anomers strongly depends on the reaction conditions implying the α/β -anomerization to the thermodynamically more stable anomer and the possibility of furanose/pyranose isomerization during the treatment of peracyl sugars with anhydrous phosphoric acid cannot be excluded. *In toto*, it appears to be rather likely the formation of β -D-arabinopyranose-1-phosphate along with the desired α -D-arabinofuranose-1-phosphate using peracetyl D-arabinofuranose as the starting compound. In this context, it is noteworthy that the MacDonald method was successfully employed up to the present study for the synthesis pyranose-1-phosphates [19]. To escape or diminish the formation of the pyranose-1-phosphates, we focused our further studies on the preparation of new starting sugars, primary hydroxyl group of which would

Table 2. The *ab initio* geometry optimization of $\alpha(\beta)$ -D-pentofuranose(pyranose)-1-phosphates (as mono sodium salts) (HyperChem, 8.1; in vacuo, basis set; medium 6-31G*)

Compound (1-Phosphate)	Positive partial charge at the C1 carbon atom	Total (binding) energy kcal/mol	Conformation of the pentofuranose(pyranose) ring
Ribo (RF- α 1P)	0.425	-808 850.3	C1- <i>exo</i>
2-Deoxyribo (dRF- α 1P)	0.454	-762 140.7	C3- <i>endo</i>
Arabino (AF- α 1P) ^a	0.464	-808 841.6	O4- <i>exo</i>
β -D-Arabinopyranose (AP- β 1P)	0.410	-808 868.5	${}^4\text{C}_1$ (more stable)
	0.451	-808 856.8	${}^4\text{C}_1$ (less stable)

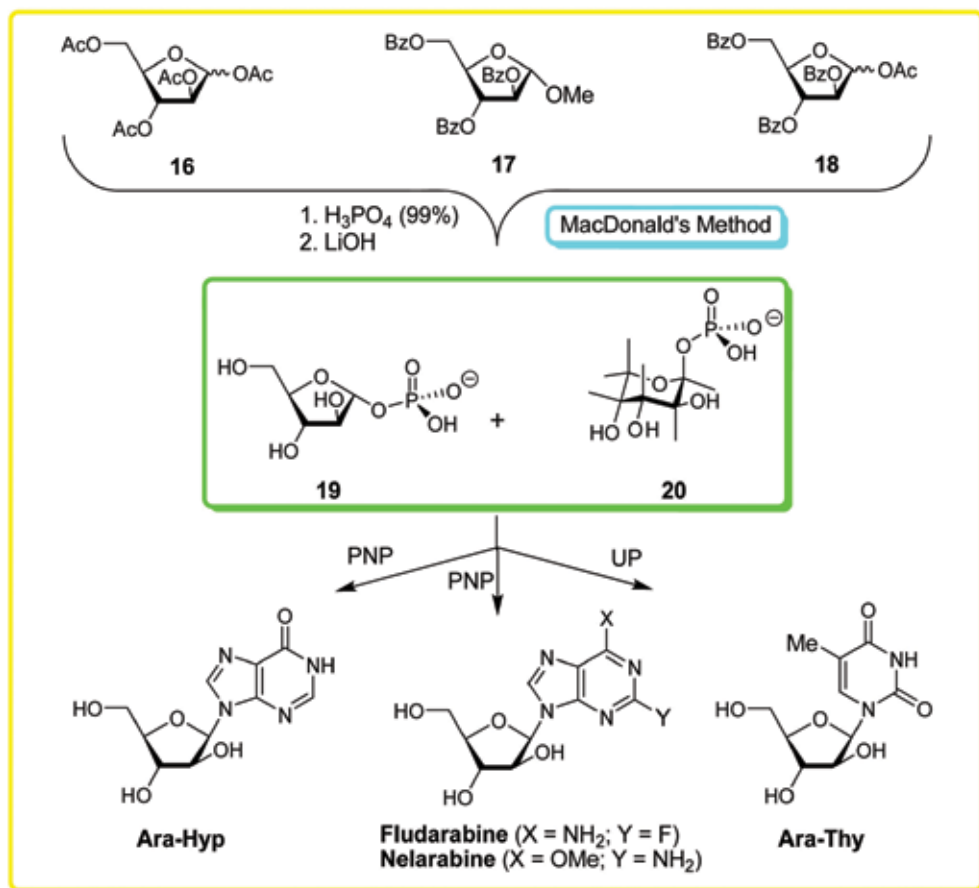
^a α -D-arabinofuranose-1-phosphate is thermodynamically less stable vs both conformers of β -D-arabinopyranose-1-phosphates, viz., ${}^4\text{C}_1$ and ${}^4\text{C}_1$; note that among the two pyranose conformers the former is more stable than the latter. Colored data are for isomeric compounds with analogous elemental composition.

be protected with an acid resistant function. However, methyl 2,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -D-arabinofuranoside (**17**) was stable under MacDonald's reaction conditions and was recovered unchanged from the reaction mixture; on the contrary, 1-*O*-acetyl-2,3,5-tri-*O*-benzoyl-D-arabinofuranose (**18**) showed good reactivity, but gave a mixture of the 1-phosphates **19** and **20** similar to that obtained from the peracetyl derivative of D-arabinose.

The mixture of isomeric phosphates Ara^F- α 1P and Ara^P- β 1P of different ratios was tested in the reaction with 2-fluoroadenine and 2-amino-6-methoxypurine catalyzed by the recombinant *E. coli* purine nucleoside phosphorylase (PNP). It was found that the pyranose phosphate Ara^P- β 1P did not interfere with the reaction of the furanose phosphate Ara^F- α 1P with purine bases. Moreover, the rate of formation of 9-(β -D-arabinofuranosyl)-2-fluoroadenine (*Fludarabine*) under optimum conditions [water solution (pH = 7.0); 55 °C, 1-3 h] was found to be similar to that of the PNP catalyzed condensation of α -D-ribofuranose-1-phosphate with 2-fluoroadenine. The reaction of furanose phosphate Ara^F- α 1P with 2-fluoroadenine is shifted towards the formation of *Fludarabine* and ca. 5% of the initial base remained after 3 h in the reaction mixture, keeping of which at 14 °C for 24 h resulted in crystallization of *Fludarabine* in 77% yield (Scheme 6) [20].

As distinct from 2-fluoroadenine, the enzymatic reaction of 2-amino-6-methoxypurine with phosphate Ara- α 1P reached equilibrium at ca. equimolar ratio of a base and its nucleoside, 2-amino-9-(β -D-arabinofuranosyl)-6-methoxypurine (*Nelarabine*). Notably that the reaction transglycosylation of 2-amino-6-methoxypurine using 1-(β -D-arabinofuranosyl)uracil as a donor of the arabinofuranose residue and the *E. coli* uridine and purine nucleoside phosphorylases as biocatalysts gave rise to the preparation of *Nelarabine* in 53% yield [22]. Unexpectedly, 2-amino-6-methoxypurine revealed lower substrate activity compared to that of 2-fluoroadenine, whereas the respective nucleoside *Nelarabine* showed higher substrate activity for PNP vs *Fludarabine*. As a consequence, the reaction reached equilibrium after 36 h at ca. equimolar concentration of the base and its nucleoside. It is noteworthy that very similar results were observed in the case of the *trans*-ribosylation [uridine as a donor of the ribofuranose residue; 23 °C; 5 mM KPB (pH 7.0)] and the *trans*-arabinosylation [1-(β -D-arabinofuranosyl)-uracil as a donor of the arabinofuranose residue; 45 °C; 5 mM KPB (pH 7.0)] of 2-amino-6-methoxypurine employing UP and PNP as biocatalysts [20].

Unexpectedly, the enzymatic reaction of hypoxanthine and a mixture of phosphates **19** and **20** (ca. 1 : 2) in the presence of PNP (172 units) in water solution (55 °C) proceeded very slowly. After 7 days, in the reaction mixture remained ca. 10% of the starting base (HPLC) and 9-(β -D-



Scheme 6

arabinofuranosyl)-hypoxanthine (Ara-Hyp) was isolated in 80% yield after standard work-up and chromatography.

The synthesis of 1-(β -D-arabinofuranosyl)thymine (ara-Thy) from thymine and the phosphate **19** (as a *ca.* 1 : 2 mixture of phosphates **19** and **20**) in water solution (55 °C) in the presence of the recombinant *E. coli* thymidine (TP) and uridine (UP) phosphorylases was studied. As expected (*cf.* [21]), TP did not catalyze the formation of the nucleoside. The formation of ara-Thy in the presence of *E. coli* UP (144 units) proceeded smoothly and *ca.* 70% of the base was transformed into ara-Thy after 7 days that was isolated in 61% yield [20].

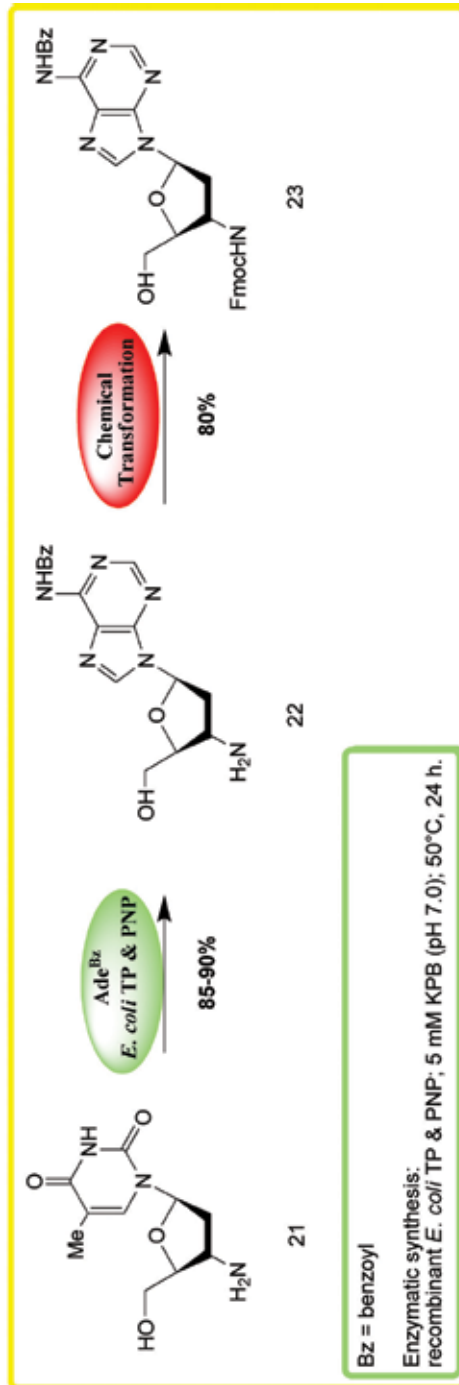
In continuation of these studies, we investigated the chemical synthesis of 2-deoxy-2-fluoro- α -D-arabinofuranose-1-phosphate (^2F Ara- α 1P) and its substrate properties for the recombinant *E. coli* nucleoside phosphorylases, as well as the cascade transformation of 2-deoxy-2-fluoro-D-arabi-

nose, D-arabinose, D-xylose and D-ribose into the corresponding β -D-pentofuranosides of 2-chloroadenine. The modified MacDonald method was employed for the synthesis of 2F Ara- α 1P and its use as a universal glycosylating agent for the nucleoside synthesis was studied in comparison with α -Ara-1P. It was found that the phosphate α - 2F Ara-1P, like α -Ara-1P, is good substrate of the recombinant *E. coli* purine nucleoside phosphorylase (PNP) and can be used for the synthesis of a number of purine nucleosides (e.g., Clofarabine and related nucleosides of 2,6-diaminopurine and hypoxanthine) as well as base modified derivatives [e.g., 5-aza-7-deaza-9-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)guanine]. Unexpectedly, the phosphate α - 2F Ara-1P, unlike α -Ara-1P, showed no substrate activity for the recombinant *E. coli* uridine phosphorylase (UP); both phosphates devoid substrate activity towards the recombinant *E. coli* thymidine phosphorylase (TP) (for a preliminary report, see [23]).

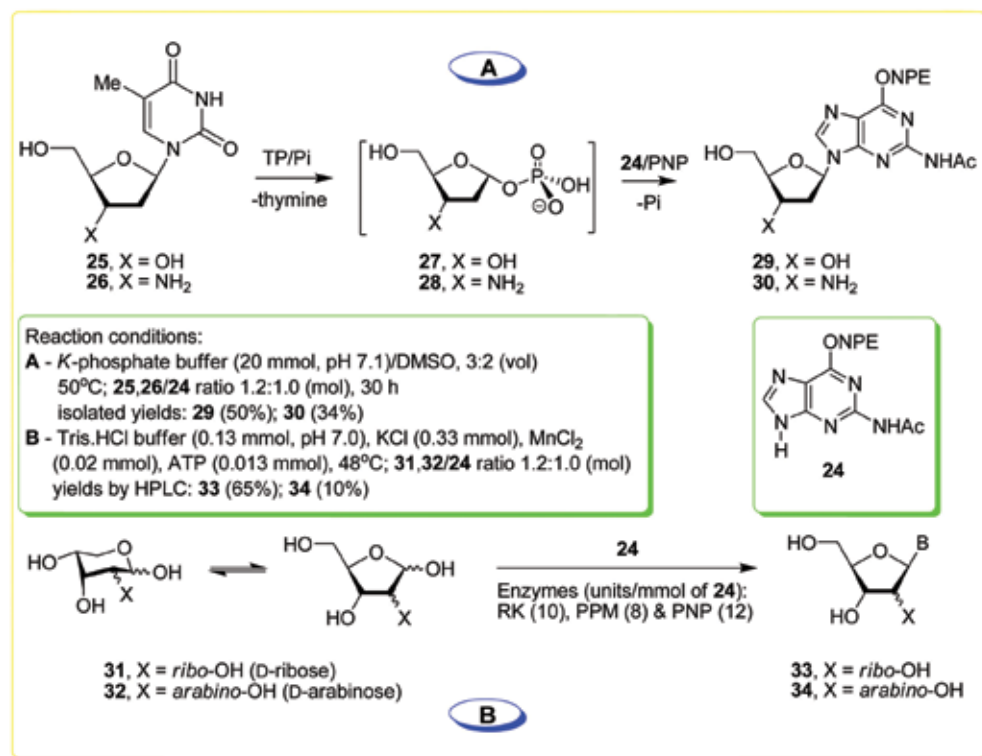
Recently we have described an enzymatic synthesis of nucleosides of N^6 -benzoyladenine and N^2 -acetylguanine using the respective acylated bases as acceptors of the pentofuranose residues and recombinant *E. coli* PNP as a biocatalyst [24]. Based on this finding, a new approach for the synthesis of orthogonally protected nucleosides was suggested and verified by the preparation of N^6 -benzoyl-2',3'-dideoxy-3'-Fmocaminoadenosine (**23**). Commercially available 3'-amino-3'-deoxythymidine (**21**) and N^6 -benzoyladenine were used as substrates of the enzymatic coupling catalyzed by *E. coli* PNP to give 3'-amino-2',3'-dideoxy- N^6 -benzoyladenine (**22**) in high yield. Standard treatment of the latter with Fmoc-OSU yielded the desired nucleoside **23** with orthogonally protected amino groups of 3'-amino-2',3'-dideoxyadenosine (Scheme 7) [24].

These studies were continued using N^2 -acetyl- O^6 -[2-(4-nitrophenyl)ethyl]guanine (**24**) [25] as an acceptor in (i) the transglycosylation reaction employing thymidine (**25**) and its 3'-aminodeoxy derivative (**26**) as donors of the pentofuranose residues and recombinant *E. coli* TP and PNP as biocatalysts (Scheme 9, path A), and (ii) the synthesis of the *ribo*- and *arabino*-nucleosides **29** and **30** in the cascade one-pot transformation of the corresponding D-ribose (**27**) and D-arabinose (**28**) into the nucleosides in the presence of the recombinant *E. coli* RK, PPM and PNP (Scheme 9, path B).

The base **24** is poorly soluble in the phosphate buffer and a 3 : 2 (vol) mixture of *K*-phosphate buffer (20 mM; pH 7.1) and DMSO was, therefore, used in the studied reactions. It was found that the base **24** displays satisfactory substrate activity for PNP and the nucleosides **29** and **30** form in the reaction mixture in 64 and 42% (HPLC data), respectively, after 30 h at 50 °C (Scheme 8, A). Both individual nucleosides have been isolated by silica gel column chromatography in 50 and 34% yields, respectively. The



Scheme 7

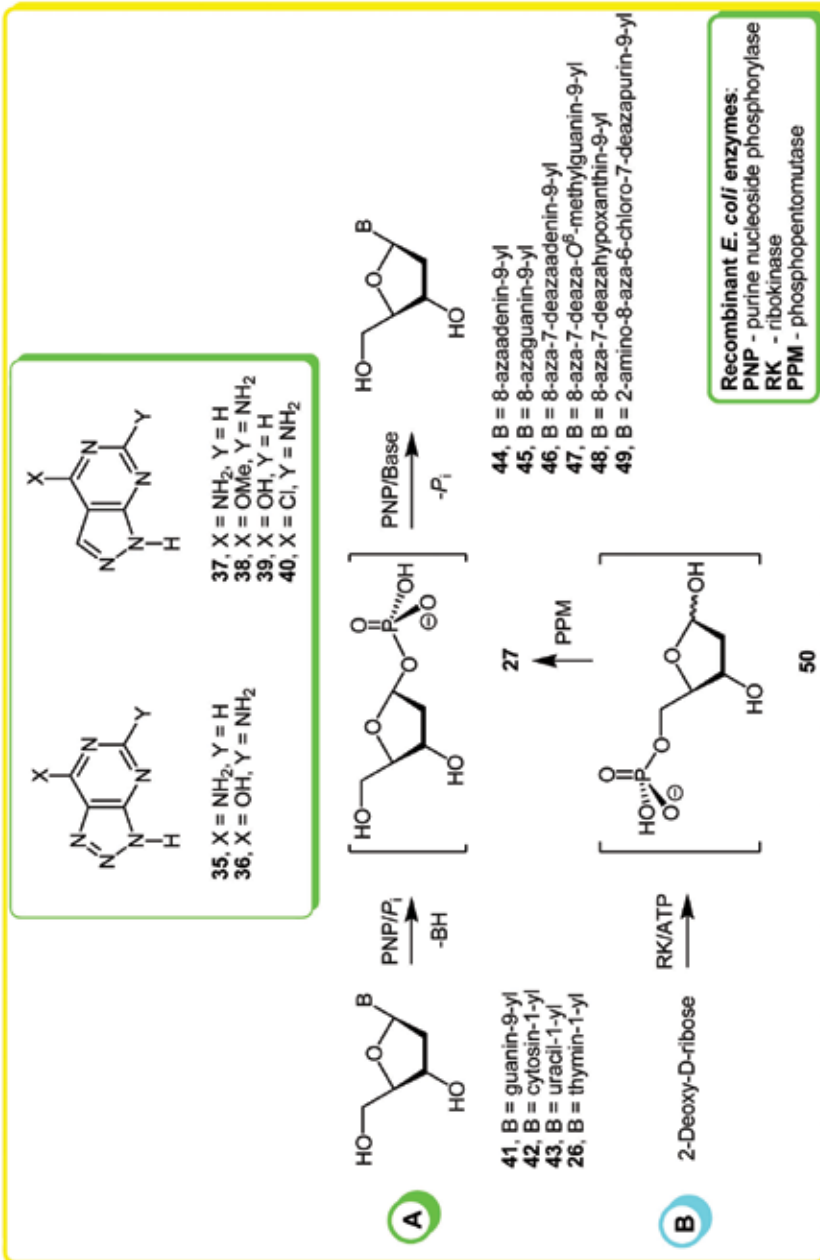


Scheme 8

use of the acceptor/donor ratio of 1.0 : 1.5 (mol) gave rise to the formation of the nucleosides **29** and **30** in 78 and 60% yields (HPLC), respectively, after 96 h at 50 °C [26].

A good substrate activity of the base **24** for PNP prompted us to test it in the one-pot synthesis of nucleosides from D-pentoses in the cascade transformation in the presence of RK, PPM and PNP (Scheme 8, **B**). It was found that the riboside **33** forms in the reaction mixture in 65% yield after incubation for 48 h at 48 °C. Under similar reaction conditions, the formation of the arabinoside **34** proceeds more slowly affording 10% of the product after 48 h.

The finding that base **24** with voluminous NPE group shows good substrate activity points to a large hydrophobic pocket in PNP active site that can accommodate this group. The dimensions of this pocket are illustrated by the overlay of imidazole fragments of the geometry optimized structures of *N*²-acetyl-*O*⁶-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]guanine and 5-morpholino-6-fluorobenzimidazole (*vide supra*) (Fig. 1).



Scheme 9

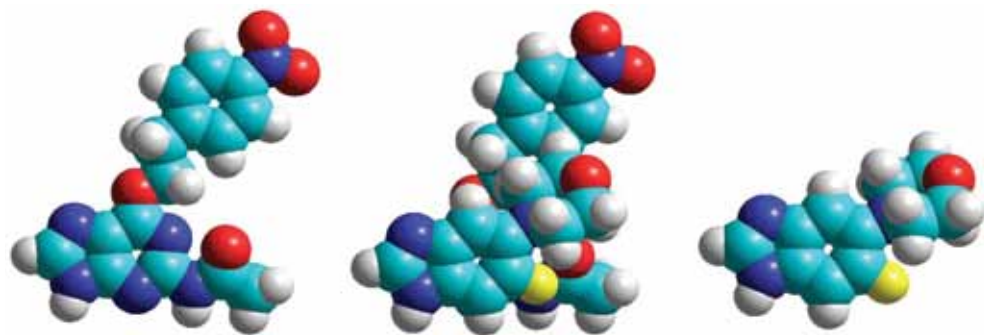


Fig. 1. The geometry optimized (HyperChem, 8.1; the *ab initio* method, in vacuo, basis set; medium 6-31G* level) structures of *N*²-acetyl-*O*⁶-[2-(4-nitrophenyl)ethyl]guanine and 5-morpholino-6-fluorobenzimidazole and overlay of imidazole fragments

Remarkably, the pocket in the *E. coli* PNP active site exceeds the dimension of purine base and allows suggesting a minimal contribution of the C⁶ amino/carbonyl groups and N¹ atom to the substrate binding.

Nucleosides of 8-azapurines and 8-aza-7-deazapurines (purine numbering throughout) are applicable as drugs and tools in chemistry, chemical biology and molecular diagnostics (see, e.g., [27–31]). Chemical synthesis of these nucleoside shape mimics suffers from the formation of mixtures of *regio*-isomers and α/β -anomers in the case of the synthesis 2-deoxy-D-pentofuranosides and arabinosides. This makes it necessary to conduct time-consuming separation. As a result, the desired nucleosides are obtained in moderate or low yields (e.g., [29, 31]).

We applied the enzyme catalyzed glycosylation to diversity of heterocyclic bases belonging to the classes of 8-azapurines (**35** & **36**) and 8-aza-7-deazapurines (**37-40**) using various donors of the 2'-deoxy-D-ribofuranosyl residue and recombinant *E. coli* PNP as a biocatalyst (transglycosylation reaction; Scheme 9; path **A**) and the enzymatic cascade transformation of 2-deoxy-D-ribose into the nucleosides (Scheme 9; path **B**) using recombinant *E. coli* RK, PPM and PNP (one-pot synthesis). The enzymatic synthesis of *N*⁹-2'-deoxy- β -D-ribonucleosides of a number of 8-azapurines (**44** & **45**) and 8-aza-7-deazapurines (**46-49**) was studied (Scheme 9) [8].

At first, the substrate activity of bases **35-39** was tested in the transglycosylation reaction performed under standard conditions using 2'-deoxyguanosine (**41**) as a glycosyl donor (Scheme 9; **A**). All these bases are satisfactory substrates and the respective nucleosides were obtained in good yields. The structure of the nucleosides **44-48** was confirmed by ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy data and UV spectra as well by comparison with

already published spectral data. We have not observed the formation of the *regio*-isomeric nucleosides.

In the next series of experiments we studied the one-pot synthesis of nucleosides **44-48** with 2-deoxy-D-ribose and heterocyclic bases **35-39** in the presence of recombinant RK, PPM and PNP (Scheme 9; path **B**). Under reaction conditions employed the formation of 8-aza-2'-deoxyadenosine (**44**) and 8-aza-2'-deoxyguanosine (**45**) proceeded slowly affording the nucleosides in moderate yields. On the contrary, 8-aza-7-deazapurines **37-39** showed satisfactory substrate activity and the respective nucleosides **46-48** were formed in yields more than 50% after 20 h [8].

The *regio*-specific 2'-deoxy-D-ribosylation of 8-azaadenine (**35**) and 8-azaguanine (**36**) catalyzed by recombinant *E. coli* PNP is in line with published data [32]. On the contrary, glycosylation of anions of 8-azapurines with 2-deoxy-3,5-di-O-(4-toluoyl)- α -D-*erythro*-pentofuranosyl chloride gave a very complex mixture of *regio*-isomers and their α,β -anomers [28, 29].

From a chemical point of view the formation of the glycosyl bond results from a nucleophilic attack of a nitrogen atom of base at the electrophilic C¹-carbon atom of 2-deoxy-D-ribofuranose-1-phosphate (**27**). The *regio*-selectivity of the enzymatic glycosylation is governed by the binding mode of base in the catalytic center of the enzyme enabling a nucleophilic attack of a nitrogen atom of the sp² hybridized imino $-\text{C}=\text{N}^9-$ tautomer at the electrophilic center of co-substrate (Scheme 1). A similar type of binding of the substrate can be tolerated with a high probability for natural purine bases as well as for 8-azapurines **35** and **36** leading to the exclusive formation of N⁹-glycosides. However, the formation of nucleosides **46-48** was rather unexpected in the light of the earlier data pointing to the crucial importance of the nitrogen-7 of purines and their isosteric analogues in the synthetic reaction catalyzed by *E. coli* PNP [2, 3, 32].

A detailed analysis of the mechanism of the phosphorolysis of purine nucleosides by *E. coli* PNP showed that the base binding site is formed mainly by Asp204 and to some extent by Phe159 [33]. Taking into account that this is an equilibrium reaction, one can expect that the same amino acid residues make the main contribution in binding of substrate in the synthetic reaction. The Asp204 interacts with the nitrogen-7 and likely the C⁶ substituents of natural purine bases giving rise, in all likelihood, to the proper base orientation and to enhancement of the nucleophilic properties of the nitrogen-9, *i.e.*, activation of the substrate. It is, therefore, surprising that replacement of the nitrogen-7 with CH group did not abolish the substrate activity of bases **37-39** pointing to the rather efficient contribution of the Asp204-C6 substituent interaction in the correct binding and activation [1]. To prove the role of such interaction, we investigated the substrate properties of base **40**, which has no groups (NH₂, carbonyl, OH

or OR) that could imitate an interaction of natural purine substrates with Asp204. It was surprising to find that base **40** still retains moderate substrate activity, despite the absence of any interactions with Asp204 and the extremely low solubility.

An analysis of the crystal structure of the ternary complex of hexameric *E. coli* PNP with Formycins A and B showed that the Ser90 is involved in binding of the bases [33a,b]. Moreover, crystallographic data for the adenine binding to the active site of *E. coli* PNP clearly showed a close proximity of Ser90 O γ to the carbon-8 of the base [33c,d]. These data together with the aforementioned considerations suggest the possible explanation for the good substrate properties of bases **46-48** and moderate activity of base **49**, viz., Ser90 O γ is hydrogen bonded to nitrogen-8 (purine numbering) of the bases giving rise to the acceptable base orientation in the catalytic site of *E. coli* PNP followed by activation of the nitrogen-9 in productive complex **27** (Fig. 2). Contribution of Phe159 of *E. coli* PNP in both processes, binding and activation, appears to be analogous to that of the natural bases. Thus, in the case of 8-aza-7-deaza purine analogs Ser90 residue of the catalytic site of *E. coli* PNP takes effect of Asp204 in the case of natural purine substrates.

The spatial tautomeric structures of base **40** in a complex with Ser90-O γ have been analyzed by the restricted Hartree-Fock (RHF) *ab initio*

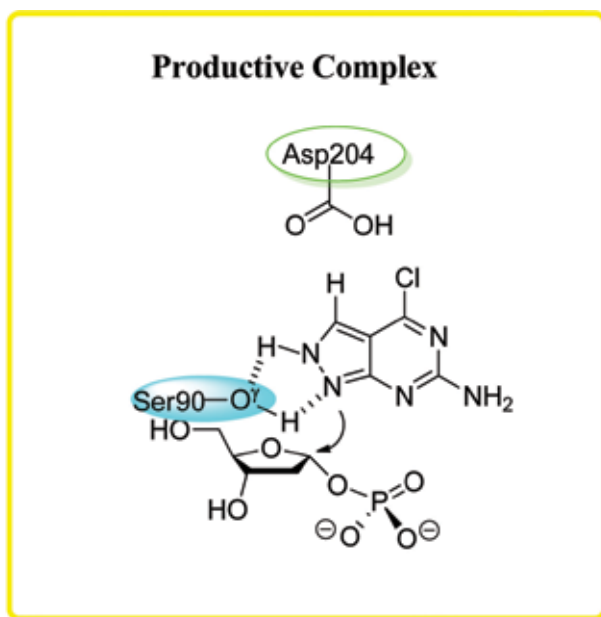


Fig. 2. Schematic presentation of productive *E. coli* PNP/base 40 complex

method using basis set of 6-31** FIREFLY QC package, which is partially based on the GAMESS (US) source code. The files of MOPAC format containing Z-matrix of internal coordinates obtained by the PM3 geometry optimization were used as starting approximation for the *ab initio* calculations. The following main dimensions were obtained for the respective structure *E. coli* PNP/base **40** – Ser90-O γ -H \cdots N⁸ 0.97 & 1.86 Å; Ser90-O γ \cdots H-N⁹ 2.39 & 0.99 Å; =N⁸-N⁹(H)- 1.39 Å; **27** – Ser90-O γ \cdots H-N⁸ 2.37 & 0.99 Å; Ser90-O γ -H \cdots N⁹ 0.96 & 1.83 Å; -N⁸(H)-N⁹= 1.37 Å; these data are in fair agreement with strong hydrogen bonding of the base enabling the correct binding followed by activation [8].

To prove this suggestion, the Ser90Ala mutant of *E. coli* PNP was prepared and its catalytic activity in the synthesis of purine and 8-aza-7-deazapurine nucleosides studied.

The transribosylation of hypoxanthine and 8-aza-7-deazahypoxanthine (allopurinol) using uridine and the recombinant *E. coli* uridine phosphorylase for the generation of intermediary α -D-ribofuranose-1-phosphate revealed the differences in the rates of formation of inosine and allopurinol riboside (AR) along with high yields of both nucleosides. In the presence of the native *E. coli* PNP, the formation of (i) inosine reached 90% after ca. 30 min and after next 30 min established an equilibrium at ca. 2 : 8 base – nucleoside ratio in the reaction mixture, and (ii) 8-aza-7-deaza-9-(β -D-ribofuranosyl)purine (AR) proceeded somewhat slowly achieving a 95% conversion of allopurinol to its N⁹-riboside 3a after 24 h, witnessing to **non-critical role of the N⁷-nitrogen atom in the binding and activation of heterocyclic substrate in the synthesis of nucleosides catalyzed by the native *E. coli* PNP**. Replacement of the native PNP with the mutated enzyme in the synthetic reactions resulted in (i) the slowing down of the rate of the inosine formation (35% yield of inosine after 1 h; an equilibrated ca. 2 : 8 mixture of base – nucleoside after 24 h), and (ii) dramatic reduction of the rate of the AR formation attaining ca. 20% yield after 48 h. These data allow implying the moderate contribution of the Ser90 residue of the catalytic center of the native *E. coli* PNP in the binding of α -D-Rib-1P. Dramatic reduction of the rate of the allopurinol riboside formation points to **an unique importance of Ser90 residue of the native *E. coli* PNP in the binding and activation of allopurinol as well as other 8-aza-7-deazapurines [especially 2-amino-8-aza-6-chloro-7-deazapurine (40)] in the enzymatic synthesis of their nucleosides** (for a preliminary report, see [34].

Conclusions

1. The pure recombinant *E. coli* ribokinase (RK), phosphopentomutase (PPM) and nucleoside phosphorylases [uridine (UP), thymidine (TP) and purine nucleoside (PNP)] were prepared on a multigram level [5–7].

2. A new strategy for the synthesis of nucleosides consisting in one-pot enzymatic transformation of D-ribose, 2-deoxy-D-ribose, D-arabinose and 2-deoxy-2-fluoro-D-arabinose in the presence of heterocyclic bases into the pyrimidine and purine nucleosides was suggested and validated. It consists in consecutive transformation of D-pentoses into nucleosides under the action of recombinant *E. coli* ribokinase (RK) [D-pentose \rightarrow pentose-5-phosphate (D-PF-5P)], PPM [D-PF-5P \rightarrow α -D-pentofuranose-1-phosphate (D-PF- α 1P)], and nucleoside phosphorylases (NPs) (D-PF- α 1P + heterobase \rightarrow nucleoside). It was unambiguously shown for the first time that 1,6-diphosphates of D-hexoses are not necessary for the transformation of 5-phosphates of D-pentoses into the corresponding 1-phosphates. Practical methods for the synthesis of antileukemic drugs (*Cladribine*, *Fludarabine*, *Nelarabine*, *Clofarabine*) and a number of biologically important nucleosides were developed [7].

3. The enzymatic *trans*-ribosylation and *trans*-2-deoxyribosylation was used for the synthesis of the corresponding nucleosides of 5,6-difluorobenzimidazole and its derivatives, one fluorine atom of which is replaced with methoxy, ethoxy, isopropoxy, 4-morpholino and *N*-methylpiperazino groups aiming at search of new biologically active nucleosides. A large pocket close to the area corresponding to the purine N^1 atom was disclosed [18].

4. The MacDonald' method was studied for the synthesis of α -D-arabinofuranose-1-phosphate (Ara^F- α 1P) using diverse starting peracyl derivatives of D-arabinose. Mixtures of different ratios of Ara^F- α 1P and β -D-arabinopyranose-1-phosphate (Ara^P- β 1P) were obtained and they will be used in the enzymatic condensations with purine and pyrimidine bases giving rise to the nucleosides, incl. *Fludarabine*, *Nelarabine* and 1-(β -D-arabinofuranosyl)-thymine. Similar approach was studied for the synthesis of antileukemic drug 9-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-2-chloroadenine (*Clofarabine*) [20, 23].

5. An enzymatic synthesis of 2'-deoxyribonucleosides of 8-azapurines and 8-aza-7-deazapurines has been studied using the transglycosylation reaction and cascade one pot synthesis from 2-deoxy-D-ribose and nucleobases. Good substrate activity of 8-aza-7-deazapurines towards recombinant *E. coli* purine nucleoside phosphorylase (PNP) was disclosed and mechanism of binding and activation of these analogs in the catalytic site of *E. coli* PNP was studied. The participation of Ser90 O^γ of *E. coli* PNP in the binding of 8-aza-7-deazapurines in the catalytic center of PNP followed by the formation of productive complex and glycosidic bond was suggested [8] and proved by the preparation of the Ser90Ala mutant of *E. coli* PNP and investigation of its substrate properties [34].

Acknowledgements

The financial support of this study by the International Science and Technology Center (www.istc.ru; project #B-1640) is gratefully acknowledged.

The authors are deeply indebted to Prof. Dr. Frank SEELA (Laboratory of Bioorganic Chemistry and Chemical Biology, Center for Nanotechnology, Heisenbergstraße 11, D-48149 Münster, Germany) for supplying most of heterocyclic bases used in the present work.

IAM is thankful to the Alexander von Humboldt-Stiftung (Bonn – Bad-Godesberg, Germany) for partial financial support of this study.

References

1. *Mikhailopulo I. A.* Biotechnology of Nucleic Acid Constituents – State of the Art and Perspectives // *Curr. Org. Chem.* – 2007. – **11**. – P. 317.
2. *Mikhailopulo I. A., Miroshnikov A. I.* New Trends in Nucleoside Biotechnology // *Acta Naturae.* – 2010. – **2(5)**. – P. 36.
3. *Mikhailopulo I. A., Miroshnikov A. I.* Biologically important nucleosides: modern trends in biotechnology and application // *Mendeleev Commun.* – 2011. – **21**. – P. 57.
4. *Doskocil J., Holy A.* // *Coll. Czech. Chem. Commun.* – 1977. – **42**. – P. 370 (see also the works cited therein); *Votruba I., Holy A., Dvorakova H. et al.* // *Coll. Czech. Chem. Commun.* – 1994. – **59**. – P. 2303.
5. *Chuvikovskiy D. V., Esipov, R. S., Skoblov, Y. S. et al.* // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – **14**. – P. 6327.
6. *Esipov R. S., Gurevich A. I., Chuvikovskiy D. V. et al.* // *Protein Expes. Purif.* – 2002. – **24**. – P. 56.
7. *Miroshnikov A. I., Esipov R. S., Konstantinova I. D. et al.* // *Open Conference Proc. J.* – 2010. – **1**. – P. 98.
8. *Stepchenko V. A., Seela F., Esipov R. S. et al.* Enzymatic Synthesis of 8-Azapurineand 8-Aza-7-deazapurine 2'-Deoxyribonucleosides // *Synlett.* – 2012. – **23**. – P. 1541.
9. *De Clercq E.* // *Adv. Virus Res.* – 2009. – **73**. – P. 1.
10. *Krosky P. M., Borysko K. Z., Nassiri M. R. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2002. – **46**. – P. 478; *Evers D. L., Komazin G., Shin D. et al.* // *Antiviral Res.* – 2002. – **56**. – P. 61; *Gudmundsson K. S., Tidwell J., Lippa N. et al.* // *J. Med. Chem.* – 2000. – **43**. – P. 2464.
11. *Prichard M. N.* // *Rev. Med. Virol.* – 2009. – **19**. – P. 215; *Williams S. L., Hartline C. B., Kushner N. L. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – **47**. – P. 2186; *Hwang J. S., Kregler O., Schilf R. et al.* // *J. Virol.* – 2007. – **81**. – P. 11604; *Hwang J. S., Schilf R., Drach J. C. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – **53**. – P. 5095.
12. *Trofe J., Pote L., Wade E. et al.* // *Ann. Pharmacother.* – 2008. – **42**. – P. 1447; *Drugs R. D.* Maribavir: 1263W94, Benzimidavir, GW 1263, GW 1263W94, VP41263. – 2007. – **8**. – P. 188; *Chou S., Marousek G. I.* // *J. Virol.* – 2008. – **82**. – P. 246.

13. Galmarini C. M., Popowycz F., Joseph B. // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – **15**. – P. 1072; Mathe C., Gosselin G. // *Antiviral Res.* – 2006. – **71**. – P. 276; Biron K. K. // *Antiviral Res.* – 2006. – **71**. – P. 154.
14. Mikhailopulo I. A., Zinchenko A. I., Bokut S. B. et al. // *Biotechnol. Letters.* – 1992. – **14**. – P. 885.
15. Mikhailopulo I. A., Kazimierczuk Z., Zinchenko A. I. et al. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* – 1994. – N 31. – P. 83.
16. Mikhailopulo I. A., Kazimierczuk Z., Zinchenko A. I. et al. // *Nucleosides Nucleotides.* – 1995. – **14**. – P. 477.
17. Bentancor L., Trelles J. A., Nybille M. et al. // *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* – 2004. – **29**. – P. 3.
18. Konstantinova I. D., Selezneva O. M., Fateev, I. V. et al. // *Synthesis.* – 2013. – **45**. – P. 272.
19. (a) MacDonald D. L. // *J. Org. Chem.* – 1962. – **27**. – P. 1107; (b) MacDonald D. L. // *Carbohydr. Res.* – 1966. – **3**. – P. 117; (c) MacDonald D. L. // *Carbohydr. Res.* – 1968. – **6**. – P. 376; (d) Mendicino J., Hanna R. // *J. Biol. Chem.* – 1970. – **245**. – P. 6113; (e) Chittenden G. J. F. // *Carbohydr. Res.* – 1972. – **25**. – P. 35.
20. Konstantinova I. D., Antonov K. V., Fateev I. V. et al. // *Synthesis.* – 2011. – N 10. – P. 1555.
21. Wright R. S., Khorana H. G. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1958. – **80**. – P. 1994.
22. Averett D. R., Koszalka G. W., Fyfe J. A. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1991. – **35**. – P. 851.
23. Fateev I. V., Antonov K. V., Konstantinova I. D. et al. The Chemo-Enzymatic Synthesis of Clofarabine and Related Nucleosides. The Role of Electronic and Stereochemical Factors of Substrates in Reactions Catalyzed by *E. coli* Nucleoside Phosphorylases / Federation of European Biochemical Societies. CONGRESS 2013 Mechanisms in Biology”; July 6–11, 2013, Saint Petersburg, Russia. Abstracts.
24. Roivainen J., Elizarova T., Lapinjoki S. et al. // *Nucleosides, Nucleotides Nucl. Acids.* – 2007. – **26**. – P. 905.
25. a) Himmersbach F., Shulz B. S., Trichtinger, T. et al. // *Tetrahedron.* – 1984. – **40**. – P. 59; b) Zhou J., Tsai J.-Y., Bouhadir K., Slevin P. B. // *Synthetic Commun.* – 1999. – **29**. – P. 3003.
26. Kulikovskiy A. I., Esipov R. S., Miroshnikov A. I., Mikhailopulo I. A. An Enzymatic Synthesis of Nucleosides of N²-Acetyl-O⁶-[2-(4-nitrophenyl)ethyl] guanine // *Collection Symp. Series.* – 2011. – **12**. – P. 397.
27. Elion G. B. // *Cancer Res.* – 1969. – **29**. – P. 2448.
28. (a) Seela F., Pujari S. // *Bioconjugate Chem.* – 2010. – **21**. – P. 1629; (b) Jiang D., Seela F. J. // *Am. Chem. Soc.* – 2010. – **132**. – P. 4016.
29. Seela F., Jiang D., Xu K. // *Org. Biomol. Chem.* – 2009. – **7**. – P. 3463, and references cited therein.
30. (a) Pokharel S., Jayalath P., Maydanovych O. et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – **131**. – 11882. (b) Veliz E. A., Easterwood L. M., Beal P. A. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – **125**. – P. 10867; (c) Wierzchowski J., Ogiela M., Iwanska B., Shugar D. // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – **472**. – P. 63.

31. (a) *Elliot R. D., Montgomery J. A.* // *J. Med. Chem.* – 1976. – **19**. – P. 1186; (b) *Kazimierczuk Z., Cottam H. B., Revankar G. R., Robins R. K.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 1984. – **106**. – P. 6379, and references therein.
32. (a) *Doskocil J., Holy A.* // *Coll. Czech. Chem. Commun.* – 1977. – **42**. – P. 370 (see also the works cited therein); (b) *Wierzchowski J., Wielgus-Kutrowska B., Shugar D.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. – **1290**. – P. 9; (c) *Votruba I., Holy A., Dvorakova H. et al.* // *Coll. Czech. Chem. Commun.* – 1994. – **59**. – P. 2303.
33. (a) *Koellner G., Luic M., Shugar D. et al.* // *J. Mol. Biol.* – 1998. – **280**. – P. 153; (b) *Koellner G., Bzowska A., Wielgus-Kutrowska B. et al.* // *J. Mol. Biol.* – 2002. – **315**. – P. 351; (c) *Bennett E. M., Li C., Allan P. W. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 47110; (d) *Zhang Y., Parker W. B., Sorscher E. J., Ealick S. E.* // *Curr. Topics Med. Chem.* – 2005. – **5**. – P. 1259; (e) *Mikleusevic G., Stefanic Z., Narczyk M. et al.* // *Biochimie.* – 2011. – **93**. – P. 1610.
34. *Fateev I. V., Esipov R. S., Antonov K. V. et al.* The Role of the Ser90 Residue of the Catalytic Site of *E. coli* PNP in the Synthesis of Purine and 8-aza-7-deazapurine Nucleosides / Federation of European Biochemical Societies. CONGRESS 2013 Mechanisms in Biology”; July 6–11, 2013, Saint Petersburg, Russia. Abstracts.

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГЕРПЕСА: 30 ЛЕТ ПОСЛЕ АЦИКЛОВИРА

А. Н. КОРОВИНА, М. К. КУХАНОВА, С. Н. КОЧЕТКОВ

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Вирус простого герпеса первого типа человека (ВПГ-1) является одним из самых распространенных патогенов. Герпесная инфекция в сочетании с другими инфекциями или иммунодефицитным состоянием пациента представляет особую опасность и может приводить к летальному исходу. Спектр лекарственных препаратов для лечения ВПГ не очень широк. Золотым стандартом противогерпесной терапии последних трёх десятилетий является препарат ацикловир (ACV). Он и его аналоги валацикловир, фамцикловир, ганцикловир чаще всего применяются в клинической практике для лечения инфекции, вызванной ВПГ-1. Однако в результате длительного применения лекарственных препаратов возникают резистентные к ним штаммы, что делает течение болезни неконтролируемым. В данном обзоре мы сфокусировались на исследовании молекулярно-генетической основы возникновения лекарственной устойчивости вируса герпеса к ACV и новых подходах к созданию соединений, которые одновременно могут подавлять развитие ацикловиррезистентных штаммов и дикой формы вируса герпеса.

Герпетическая инфекция человека охватывает не менее 80% населения земного шара, а ее наиболее частая форма — генитальный герпес, имеющий выраженный рецидивирующий характер течения, имеет повсеместное распространение и является одной из центральных проблем как в России, так и за рубежом. Кроме того, герпетическая инфекция практически всегда присутствует у людей, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), что осложняет течение СПИД, вызываемого ВИЧ, и способствует быстрому летальному исходу [1]. Среди ВИЧ инфицированных пациентов, коинфицированных вирусом герпеса, около 6–10% имеют штаммы вируса, резистентные к имеющимся антигерпетическим препаратам. На сегодняшний день идентифицировано восемь типов герпесвирусов, заражающих человека: вирусы простого герпеса (ВПГ) первого и второго типа, вирус ветряной оспы (тип 3), вирус Эпштейна-Барр

Принятые сокращения: VZV — вирус варицелло-зостер; PFA — фосфоноформиат (фоскарнет); GCV — ганцикловир; PCV — пенцикловир; ACV — ацикловир; HPAACV 5'-фосфит ацикловира.

(тип 4), цитомегаловирус человека (тип 5), розеоловирусы (ВГЧ-6А, 6В и 7) и герпесвирус человека типа 8 (ВГЧ-8), ассоциированный с саркомой Капоши. Вирус Эпштейна-Барр и ВГЧ-8 являются онкогенами [2, 3]. Для представителей семейства *Herpesviridae* характерны следующие общие свойства:

1. Геномы вирусов кодируют значительное число ферментов метаболизма нуклеиновых кислот (тимидинкиназу, рибонуклеотидредуктазу, ДНК-полимеразу, хеликазу, праймазу) и протеинкиназу.

2. Синтез ДНК и сборка вирусного капсида происходит в ядре, созревание вириона – в цитоплазме.

3. Литический характер вирусов, т.е. образование нового инфекционного поколения сопряжено с разрушением клетки.

4. Способность поддерживать в клетках хозяина латентную инфекцию. Латентный геном сохраняет способность реплицироваться и вызывать болезнь при рецидивной инфекции.

Большинство современных препаратов для лечения герпетических инфекций основаны на использовании в качестве лекарственных средств модифицированных нуклеозидов или их депо-форм [4]. Действие этих препаратов направлено, главным образом, на подавление активности вирусной ДНК-полимеразы. Следует отметить, что препараты не избавляют пациентов от рецидивирующего характера течения болезни, а результатом их длительного приёма может стать возникновение резистентных штаммов вируса. Эти обстоятельства делают актуальным поиск новых антигерпетических препаратов и их мишеней. В этом сообщении приведены данные о применении клинически одобренных антигерпетических препаратов, а также по поиску новых эффективных и малотоксичных веществ, подавляющих репликацию ВПГ-1 человека, ведущемуся, в том числе, и в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН.

Клинически одобренные антигерпетические препараты

Аналоги нуклеозидов и их депо-формы играют основную роль при создании антигерпетических препаратов [5]. Первый антигерпетический препарат нуклеозидной природы – 5-иодо-2'-дезоксисуридин, использовавшийся в клинической практике для лечения герпесного кератита, появился в конце 50-х годов 20-го века. В следующие два десятилетия для терапии были одобрены трифтортимидин, аденин арабозид и бромвиниддезоксисуридин, также являющиеся аналогами нуклеозидов. Эти препараты, однако, имели низкую селективность и проявляли достаточно высокую токсичность, вследствие чего их использовали только для наружного применения. Второе поколение антигерпетических препаратов было

создано на основе ациклических нуклеозидов (ацикловир, валацикловир, ганцикловир, пенцикловир, фамцикловир), подавляющих инфекции, вызываемые HSV-1, HSV-2, VZV и цитомегаловирусом [6–10].

Ацикловир и валацикловир

Ацикловир (ACV, раннее название – ациклогуанозин) был впервые синтезирован компанией Burroughs Wellcome в рамках программы по поиску гуанозиновых нуклеозидов, устойчивых к действию фосфорилаз. С появлением ацикловира (рис. 1, а) началась новая эра в развитии антигерпетической химиотерапии.

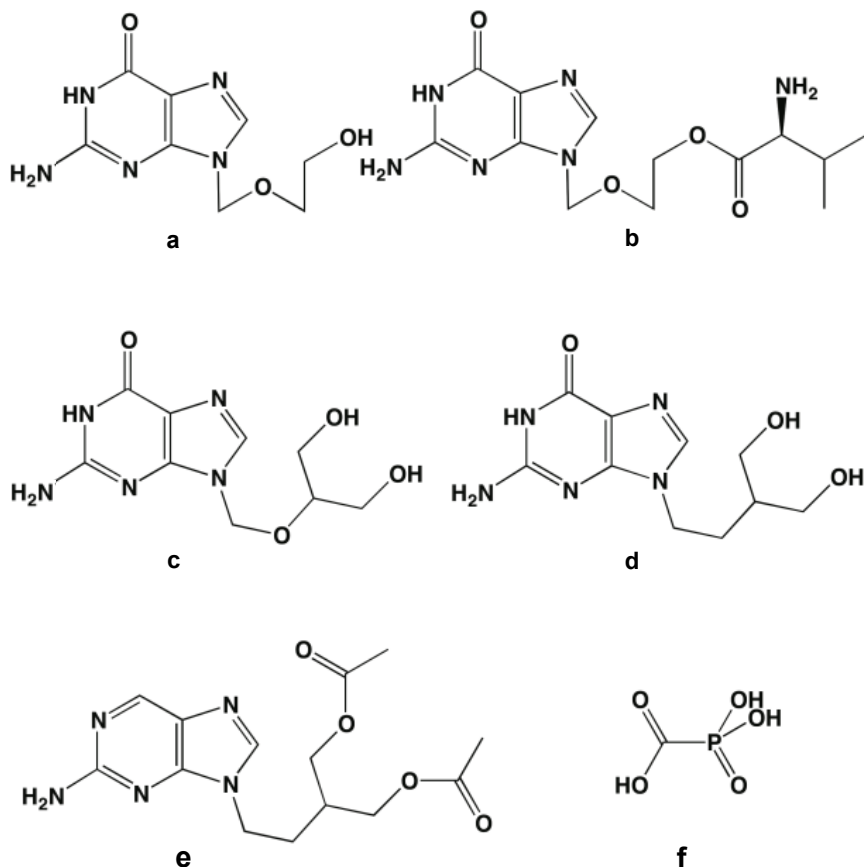


Рис. 1. Структурные формулы противогерпетических препаратов, применяемых в клинике: (а) ацикловир, (b) валацикловир, (c) ганцикловир, (d) пенцикловир, (e) фамцикловир, (f) фоскарнет

Ацикловир оказался эффективным и малотоксичным препаратом. Механизм действия ацикловира основан на его фосфорилировании вирусной тимидинкиназой с образованием соответствующего монофосфата (АСVMP). Последующие две стадии фосфорилирования катализируют киназы клетки-хозяина с образованием трифосфата (АСVTP), который является субстратом вирусной ДНК-полимеразы, включается в цепь вирусной ДНК и блокирует ее синтез [11]. До настоящего времени ацикловир является золотым стандартом при поиске антигерпесных препаратов [12], а автор его разработки, Гертруда Элайн, получила Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1988 году.

Недостатком ацикловира были низкая биодоступность, плохая растворимость и короткое время жизни препарата в крови. В связи с этим для поддержания необходимой концентрации ацикловира в крови пациентов необходимы были достаточно большие дозы и частое введение препарата, что, в свою очередь, повышало токсичность. Оральная биодоступность ацикловира составляет согласно разным источникам 10–20%, а растворимость – около 0,2%. Для улучшения растворимости и повышения биодоступности были синтезированы депо-формы ацикловира, а именно: 2'-О-глицил- и 2'-О-аланилацикловир [4]. Однако при клинических исследованиях препараты проявили достаточно высокую токсичность.

Эффективным и безопасным препаратом оказался валиновый эфир ацикловира – валацикловир (рис. 1, б). Повышенная оральная биодоступность валацикловира, вероятно, является результатом быстрой кишечной абсорбции, регулируемой транспортёром пептидов 1 (hPEPT1), и последующего эффективного превращения препарата в ацикловир в результате гидролиза в тонком кишечнике [4].

Одна из последних описанных в литературе модификаций ацикловира, которая существенно повышала его биодоступность, – биотинилирование. Соединения, содержащие биотиновую группировку, остаток ацикловира и гидрофобный линкер транспортировались в клетку натрийзависимым транспортёром мультивитаминов (SMVT). Скорость накопления таких веществ в клетке была приблизительно в 13 раз выше, чем ацикловира, при такой же цитотоксичности (1).

Ганцикловир

Ганцикловир (GCV) – 9-(1,3-дигидрокси-2-пропoxиметил)гуанин – ациклический аналог гуанозина (рис. 1, с), структура которого близка к структуре ацикловира [14]. Препарат значительно эффективнее ацикловира в отношении цитомегаловируса (CMV) и используется для лечения заболеваний, вызванных последним у пациентов

с ослабленным иммунитетом, в частности, при цитомегаловирусном ретините (воспаление сетчатки глаза) у больных СПИДом. Как и в случае ацикловира, оральная биодоступность ганцикловира низка, и, чтобы преодолеть эту проблему, впоследствии был синтезирован валганцикловир – валиновый эфир ганцикловира [15].

Пенцикловир и фамцикловир

Пенцикловир (PCV, рис. 1, d) представляет собой ациклический аналог гуанозина со структурой, близкой структурам ацикловира и ганцикловира, но без кислорода в ациклической «сахарной» части и с ОН-группой в позиции, эквивалентной 3'-ОН-группе природного дезоксинуклеозида. Впервые PCV был синтезирован в лабораториях Beecham Pharmaceuticals. В экспериментах на клеточных линиях препарат был менее активен по отношению ВПГ-1 ($IC_{50} = 0,4 \pm 0,1$ мкг/мл), чем ацикловир ($IC_{50} = 0,2 \pm 0,2$ мкг/мл), но эффективно подавлял репликацию ВПГ-3 ($IC_{50} = 3,1 \pm 0,8$ мкг/мл). Интересно, что при высокой множественности инфицирования клеток вирусом, PCV был активнее, чем ACV, и, в отличие от ацикловира, подавлял развитие штамма ВПГ-1, несущего ген мутантной ДНК-полимеразы ($IC_{50} = 1,5$ мкг/мл) [16].

Аналогично ацикловиру, пенцикловир превращается в монофосфат вирусной тимидинкиназой. Первоначальное превращение PCV в пенцикловирмонофосфат более эффективно, чем фосфорилирование ACV, однако трифосфат пенцикловира, образующийся в инфицированных клетках, является менее эффективным ингибитором синтеза вирусной ДНК, чем ACVTP, а его оральная биодоступность ниже, чем у ацикловира. Для улучшения свойств препарата была синтезирована его депо-форма – фамцикловир (рис. 1, e), являющийся диацетильным производным пенцикловира [4]. Фамцикловир превращается в пенцикловир *in vivo* под действием эстеразы, катализирующей удаление ацетильных групп, и альдегидоксидазы, окисляющей пуриновое основание. Следует отметить, что в культурах тканей фамцикловир не обладает противовирусной активностью, так как в них не происходит окисления пенцикловира, но многочисленные исследования *in vivo* показали, что при пероральном применении он эффективно подавляет ВПГ в различных животных моделях. В экспериментальной инфекционной модели на мышах с подавленным иммунитетом фамцикловир оказался более эффективным, чем ацикловир в элиминации вируса из поражённых органов (ухо, мозг). Еще одним из преимуществ фамцикловира является его способность предотвращать латентную инфекцию ВПГ-1. Было показано, что значительно меньше латентного вируса обнаруживается

в ганглиях мышей, которых лечили фамцикловиrom по сравнению с валацикловиrom. Причины предотвращения рецидивной инфекции фамцикловиrom в условиях, когда валацикловиrom не приводит к таким результатам, остаются пока без объяснения.

Фоскарнет

Фоскарнет (PFA) (рис. 1, f) представляет собой аналог пирофосфата и является ненуклеозидным ингибитором ДНК-полимеразы ВПГ. Фоскарнет неконкурентно (по отношению к нуклеотидам) связывается с активным центром фермента и имитирует уходящую пирофосфатную группу, препятствуя связыванию входящего нуклеозидтрифосфата [17]. PFA применяется в клинике только тогда, когда лечение ацикловиrom и другими нуклеозидными препаратами невозможно в связи с возникшей резистентностью к нуклеозидным препаратам. PFA подавляет синтез вирусной ДНК при концентрациях, сопоставимых с таковыми для ацикловира, однако он обладает значительно более высоким уровнем цитотоксичности, вызывает побочные эффекты и должен применяться внутривенно, а не перорально [18].

Поиск новых антигерпетических препаратов

В литературе описан ряд новых интересных производных нуклеозидов, обладающих противогерпетической активностью, например, ациклический – H2G (рис. 2, a) и карбоциклические – циклобутановый (лобукавир) (рис. 2, b) и циклопропановый (A-5021) аналоги гуанина (рис. 2, c). Однако после клинических испытаний соединения не были одобрены как лекарственные препараты из-за высокой токсичности [19].

Фосфонатные производные нуклеозидов

В настоящее время в клинике используется три фосфонатных производных ациклических нуклеозидов, которые активируются в клетке, минуя стадию первичного фосфорилирования: аналог цитидина сидофовир, используемый для лечения цитомегаловирусной инфекции, и аналоги аденина – адефовир и тенофовир, применяемые в терапии гепатита В и ВИЧ соответственно. Противогерпетическое действие фосфонатных производных ацикловира ранее описано не было, в связи с чем исследования потенциальной активности фосфонатных производных ACV и других нуклеозидов представляли определенный интерес.

В нашей лаборатории были синтезированы фосфонатные (Z)- и (E)-изомеры 9-[3-(фосфонометоксипроп)-1-ен-1-ил] аденина (14)

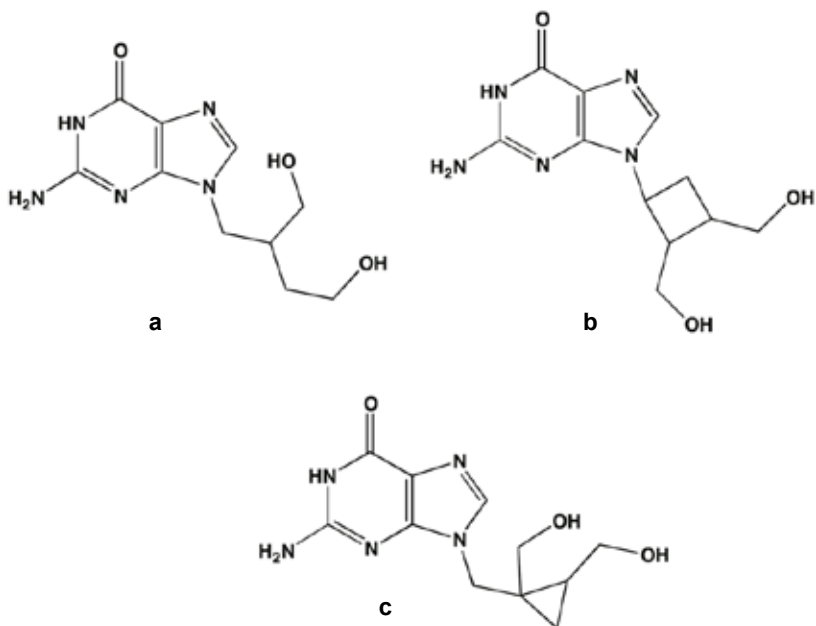


Рис. 2. Структурные формулы : H2G (a), лобукавир (b), A-5021 (c)

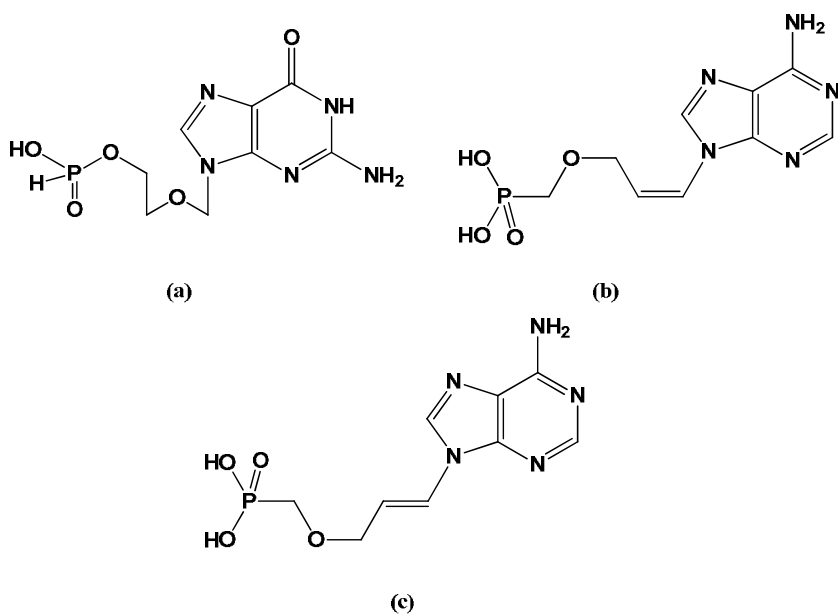


Рис. 3. Фосфонатные производные нуклеозидов: HPrACV (a), (Z)-9-[3-(фосфометоксипроп)-1-ен-1-ил] аденин (b), (E)-9-[3-(фосфометоксипроп)-1-ен-1-ил] аденин (c)

и фосфонатный аналог ацикловира (фосфит ацикловира, НрАСV) (рис. 3) [20].

Ациклические фосфонатные аналоги аденина (рис. 3, b и c) ингибировали репликацию ВПГ-1 в культуре клеток Vero, причем концентрация Z-изомера (b), подавляющая развитие вируса на 50% (IC_{50}) была близка к концентрации РМЕА, известного антигерпетического препарата. Активность E-изомера (c) в аналогичных экспериментах была существенно ниже. Механизм действия соединений заключается в их фосфорилировании до дифосфатфосфонатов аденина, которые избирательно включаются в цепь вирусной ДНК и терминируют ее синтез. Оба изомера подавляли также резистентные к ацикловиру штаммы вируса, дефицитные по тимидинкиназе, так как для их активации не требуется первой стадии кинирования. Интересным свойством этих соединений была их способность подавлять репликацию вируса иммунодефицита человека в культуре клеток при концентрациях близких к РМЕА. Синтезированные дифосфаты соединений были субстратами как обратной транскриптазы ВИЧ, так и ДНК-полимеразы вируса герпеса, включались в 3'-конец праймер-матричного комплекса и терминировали дальнейшую элонгацию [21]. Полученные соединения являются одним из немногих описанных в литературе примеров, одновременно влияющих на развитие как ВИЧ, так и вируса герпеса.

Интересными оказались свойства Н-фосфоната ацикловира. НрАСV подавлял репликацию ВПГ в культуре клеток и снижал вероятность летального исхода для инфицированных ВПГ лабораторных животных [22]. Было отмечено, что подобно ацикловиру, НрАСV в комбинации с интерфероном α проявляет синергидный эффект [23]. Характерной чертой НрАСV было подавление ацикловиррезистентных штаммов вируса, дефицитных по тимидинкиназе, при этом его концентрация была всего в два раза выше, чем в случае ацикловирчувствительных штаммов (в аналогичных экспериментах концентрация ацикловира, ингибирующая эти штаммы, увеличивалась почти в 500 раз [24]). При этом появление резистентных к НрАСV штаммов отмечалось через восемь пассажей, в то время как резистентность к ацикловиру была обнаружена через четыре пассажа, причем диапазон применяемых концентраций веществ был для НрАСV 100–800 мкг/мл, а для АСД 2,5–100 мкг/мл. Эти результаты показывают, что резистентность к НрАСV возникает существенно медленнее и при более высоких концентрациях по сравнению с АСВ, что указывает на то, что в отличие от ацикловира, НрАСV ингибирует репликацию вируса без участия тимидинкиназы. При исследовании метаболизма НрАСV на клетках Vero было показано, что после

проникновения в клетку он в значительной степени непосредственно превращается в монофосфат ацикловира (АСVMP) и только небольшая его часть гидролизует до АСV [10].

В нашей лаборатории был проведен сравнительный молекулярно-генетический анализ мутаций, возникающих при пассировании вируса в присутствии НрАСV и АСV и приводящих к резистентным штаммам как к НрАСV, так и к АСV соответственно (см. ниже). Результаты этого анализа показали, что механизм, приводящий к подавлению вируса в присутствии АСV и НрАСV различен.

Производные триазинов

Совместно с Институтом органического синтеза им. Постовского (Екатеринбург) нами были изучены ациклические производные 1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она как ингибиторы репликации ВПГ-1 в культуре клеток Vero [25]. Структурные формулы соединений приведены на рис. 4.

Было показано, что синтезированные соединения проявляют умеренную антигерпетическую активность на культуре клеток. Для изучения механизма действия были синтезированы трифосфаты указанных соединений и показано, что они ингибируют ДНК-полимеразу вируса герпеса, причем их активность зависит от структуры соединения. Трифосфат соединения 3с (рис. 4), несущий метилтио-группу, наиболее эффективно ингибирует встраивание радиоактивно-меченого АМФ в 3'-конец праймер-матричного ком-

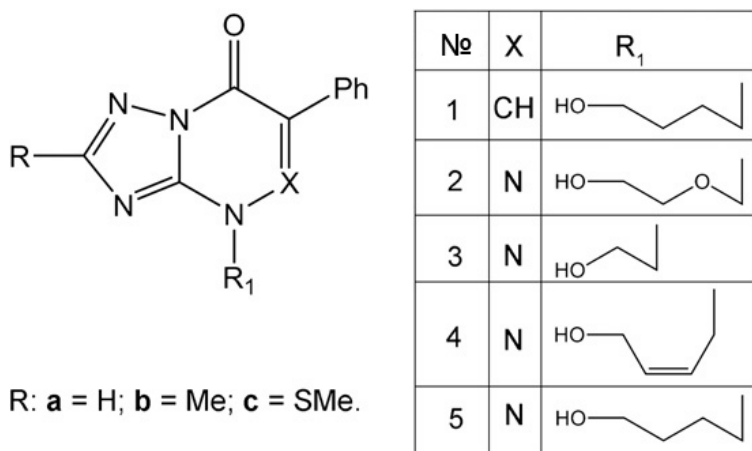


Рис. 4. Структурные формулы производных 6-фенил-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидина и (2-5) 6-фенил-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-она

плекса. На основании полученных результатов можно предположить, что одной из мишеней действия соединений является герпесвирусная ДНК-полимераза. Пока мы не знаем, являются ли они ингибиторами нуклеозидного типа и связываются с активным центром фермента или нуклеозидного и связываются с ферментом вне активного центра. Испытанные соединения представляют собой новый тип ингибиторов вируса герпеса.

Молекулярно-генетический анализ клинических, резистентных к ацикловиру штаммов ВПГ

Как было сказано выше, длительное применение лекарственных препаратов приводит к появлению резистентных штаммов вируса, что делает течение болезни неконтролируемым. Так, 4–7% изолятов ВПГ-1, полученных от иммунодефицитных пациентов, обладают устойчивостью к АСВ. В 95% случаев устойчивость к ацикловиру обусловлена мутациями в гене тимидинкиназы и только в 5% случаев мутациями в гене ДНК-полимеразы, но встречаются также вирусы, мутантные по обоим ферментам [26].

В генах тимидинкиназы и ДНК-полимеразы клинических изолятов и лабораторных штаммов, резистентных к ацикловиру и другим препаратам выявлено большое количество мутаций, ряд из которых приводит к потере активности фермента и возникновению резистентности к препаратам, активность которых зависит от тимидинкиназы вируса (ацикловир, пенцикловир, ганцикловир и другие нуклеозидные препараты).

На рис. 5 показано расположение мутаций в тимидинкиназе клинических изолятов вируса, резистентных к антигерпетическим препаратам.

Мутация R220H приводит к потере чувствительности вируса к ацикловиру [27], пенцикловиру и ганцикловиру, мишенью которых является вирусная тимидинкиназа. В работе [28] описана аналогичная мутация R220K в гене тимидинкиназы ВПГ-2, приводящая совместно с другими заменами к изменению субстратной специфичности фермента. Чувствительность резистентного к ацикловиру лабораторного штамма, несущего эту мутацию, к другим препаратам, например GCV и BVDU также снижена на 1-2 порядка. В то же время соединение АгаА, механизм действия которого не зависит от вирусной тимидинкиназы [23], подавляет репликацию этого штамма почти также, как и штамма дикого типа. Мы показали, что эта мутация присутствует в гене тимидинкиназы лабораторного штамма, резистентного к НрАСВ. Однако она не влияет на активность НрАСВ,

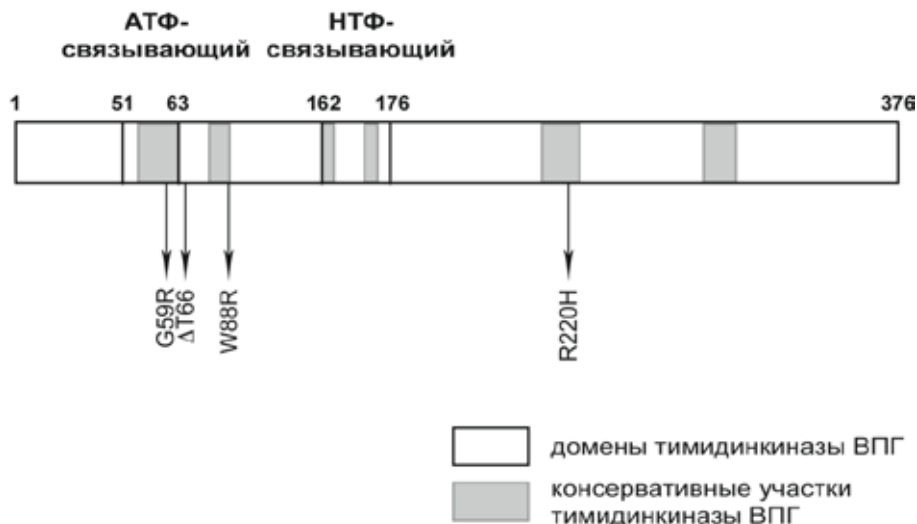


Рис. 5. Расположение аминокислотных замен из разных клинических изолятов относительно консервативных участков и доменов тимидинкиназы ВПГ-1

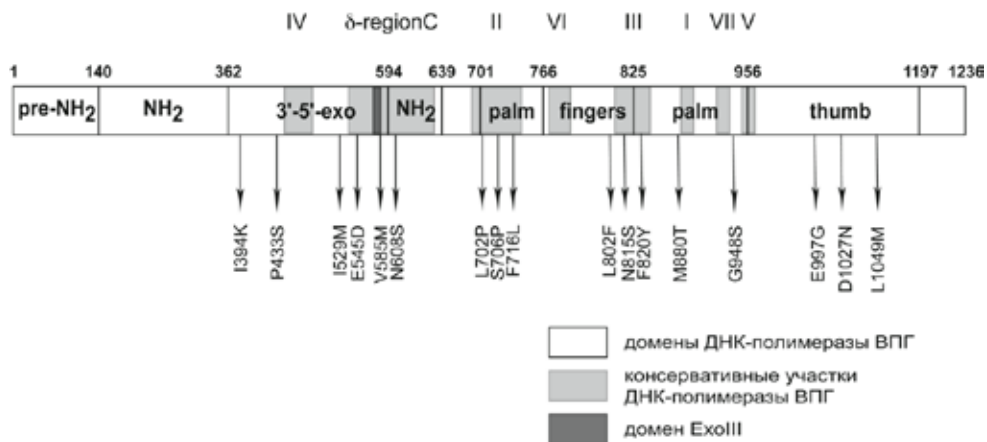


Рис. 6. Расположение аминокислотных замен из разных клинических изолятов относительно консервативных участков и функциональных доменов ДНК-полимеразы ВПГ-1

так как механизм его действия также не зависит от тимидинкиназы [27]. Мутация G59R находится в АТФ-связывающем сайте фермента, важном элементе для его функционирования (рис. 5), поэтому мутация играет существенную роль в снижении его активности.

В ДНК полимеразе ВПГ-1 было идентифицировано более 20 мутаций, ряд из которых существенен для функционирования фермента. Расположение мутаций в гене ДНК-полимеразы показано на рис. 6.

Замены I394K, P433S и V585M находятся в 3'-5'-экзонуклеазном домене фермента, причем мутация V585M располагается в консервативном участке E_hIII (572-585). В работе [29] показано, что мутации в этом участке влияют на чувствительность вируса к препаратам. Согласно литературным данным, мутация D581A, расположенная в непосредственной близости от V585M, приводит практически к полной потере 3'-5'-экзонуклеазной корректирующей активности фермента при частичном сохранении полимеразной активности [19]. Потеря или изменение корректирующей активности приводит к снижению точности синтеза ДНК-полимеразой и следовательно к повышению скорости возникновения мутаций.

Мутация N608S находится в консервативном δ-участке С и приводит к устойчивости лабораторного штамма ВПГ-1 к АСV и НpАСV [24]. Было показано, что замена L702H в консервативном участке II ДНК полимеразы ВПГ-1 вызывает резистентность вируса к ацикловиру и сохранению чувствительности или незначительной резистентности по отношению к пенцикловиру и ганцикловиру. Замена гидрофобного лейцина 702 на пролин может способствовать изменению конформации β-листа в домене ладони, участвующего в координировании ионов магния и трифосфатного участка в активном центре фермента [30]. Аналогичный эффект вызывает мутация F716L, поскольку она располагается рядом с аминокислотным остатком D717, участвующим в координации ионов магния. При замене гидрофобного валина 715 на более полярный метионин происходит потеря чувствительности вируса к ацикловиру [31], а замена соседнего гидрофобного фенилаланина 716 на полярный лизин также имеет сильное влияние на чувствительность фермента к этому препарату [27].

Согласно с кристаллографическими данными [8], мутация M880T расположенная достаточно близко от каталитической триады (D717, D886 и D888) и участка связывания фосфатного остатка нуклеозидтрифосфата и ионов магния, может создать стерические препятствия для связывания остатков фосфата и привести к снижению чувствительности вируса, как к аналогам нуклеозидов, так и к PFA.

По данным литературы [32], замена N815S приводит к устойчивости штамма к ацикловиру и его аналогам. По кристаллографическим данным (2) боковая цепь N815 находится напротив основания

нуклеотида, входящего в активный центр фермента. Компьютерное моделирование позволяет предположить, что боковая цепь мутантного остатка S815 имеет пространственную ориентацию, отличную от таковой остатка N815 исходного штамма, мутантная по этому остатку полимеразы не встраивает АСVMP в растущую цепь ДНК [33].

Нами проанализированы мутации в тимидинкиназе и ДНК-полимеразе четырех клинически изолированных штаммов вируса герпеса, резистентных к ацикловиру (Avd, Che, Tot, Sha) и показано, что большинство мутаций, обуславливающих резистентность, совпадают с уже описанными в литературе [27].

Однако в изоляте Che впервые были обнаружены аминокислотные замены в ДНК-полимеразе I159M и E545D, которые находятся в 3→5 экзонуклеазном домене и могут влиять на активность фермента. Большинство мутаций в ДНК-полимеразе, найденных в штамме Sha, также располагаются в экзонуклеазном центре, что обычно приводит к снижению корректирующей активности и обуславливает резистентность вируса к АСV. Таким образом, резистентность как клинических, так и лабораторных штаммов объясняется мутациями как в ДНК-полимеразе, так и тимидинкиназе вируса герпеса, причем замены одного и того же аминокислотного остатка на другие аминокислотные остатки по-разному влияют на чувствительность ферментов к различным антигерпетическим препаратам.

Данный обзор не претендует на полное изложение всего огромного материала по поиску антигерпетических препаратов. Со времени открытия ацикловира прошло 30 лет и за это время появилось много эффективных препаратов, пришло существенное понимание стратегии поиска препаратов, одной из которых является создание депо-форм. Было опубликовано много обзоров и подробных статей с описанием экспериментальных и клинических исследований (например, [33]). Мы хотели только показать, что изучение вируса герпеса и поиск ингибиторов до сих пор остается важной проблемой и требует усилий химиков, биологов, фармацевтов.

Благодарности

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 12-04-00581.

SEARCH OF INHIBITORS OF VIRAL REPLICATION HERPES: 30 YEARS AFTER ACYCLOVIR

A. N. Korovina, M. K. Kukhanova, S. N. Kochetkov

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy
of Sciences, Moscow*

Herpes simplex virus (HSV-1) is one of the most widespread human pathogens. When accompanying other diseases or in immunocompromised patients, HSV may cause serious health problems and even death. The number of drugs active against herpes virus is limited. Acyclovir (ACV) is the golden standard of antiherpesviral therapy for last three decades. Currently HSV infection is treated mainly with acyclovir and its analogs: valacyclovir, famcyclovir, gancyclovir. However, prolonged use of these drugs results in emergence of resistant viral strains, thus making the disease uncontrolled. We have brought into focus the molecular basics of drug resistance emergence and the new approaches to the design of compounds effective against both drug-resistant and native HSV strains.

Благодарности

Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 12-04-00581.

Литература

1. Coen D. M., Schaffer P. A. // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2003. – **2**. – P. 278–288.
2. Raab-Traub N. // *Curr. Opin. Virol.* – 2012. – **2**. – P. 453–458.
3. Mesri E. A., Cesarman E., Boshoff C. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – **10**. – P. 707–719.
4. De Clercq E., Fiekd H. J. // *Br. J. Pharmacol.* 2006. – **147**. – P. 1–11.
5. De Clercq E. // *J. Clin. Virol.* – 2001. – **22**. – P. 73–89.
6. Bogani F., Boehmer P. E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – **105**. – P. 11709–11714.
7. Bogani F., Corredeira I., Fernandez V. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – **285**. – P. 27664–27672.
8. Liu S., Knafels J. D., Chang J. S. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**. – P. 18193–18200.
9. Terrell S. L., Coen D. M. // *J. Virol.* – 2012. – **86**. – P. 11057–11065.
10. Dorsky D., Crumacker C. // *Antiviral Res.* – 1987. – **9**. – P. 92.
11. Elion G. B., Furman P. A., Fyfe J. A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. – **74**. – P. 5716–5720.
12. Schaeffer H. J., Beauchamp L., de Miranda P. et al. // *Nature.* – 1978. – **272**. – P. 583–585.

13. *Vadlapudi A. D., Vadlapatla R. K., Earla R. et al.* // *Pharmaceutical Res.* – 2013. – **30**. – P. 2063–2076.
14. *Martin J. C., Dvorak C. A., Smee D. F. et al.* // *J. Med. Chem.* – 1983. – **26**. – P. 759–761.
15. *Thust R., Tomicic M., Klocking R. et al.* // *Cancer Gene Ther.* – 2000. – **7**. – P. 107–117.
16. *Boyd M. R., Bacon T. H., Sutton D., Cole M.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1987. – **31**. – P. 1238–1242.
17. *Oberg B.* // *Pharmacol. Ther.* – 1989. – **40**. – P. 213–285.
18. *Helgstrand E., Eriksson B., Johansson N. G. et al.* // *Science.* – 1978. – **201**. – P. 819–821.
19. *De Clercq E., Andrei G., Snoeck R. et al.* // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2001. – **20**. – P. 271–285.
20. *Ivanov A. V., Andronova V. L., Galegov G. A., Jasko M. V.* // *Bioorg. Chem.* – 2005. – **31**. – P. 65–72.
21. *Коровина А. Н., Ясько М. В., Иванов А. В. и др.* // *Вестник московского университета. Серия 2. Химия.* – 2008. – **49**. – С. 108–111.
22. *Karpenko I. L., Jasko M. V., Andronova V. L. et al.* // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2003. – **22**. – P. 319–328.
23. *Skoblov Y. S., Karpenko I. L., Jasko M. V. et al.* // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2007. – **69**. – P. 429–434.
24. *Gus'kova A. A., Skoblov M. Y., Korovina A. N. et al.* // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2009. – **74**. – P. 382–389.
25. *Deev S. L., Yasko M. V., Karpenko I. L. et al.* // *Bioorg. Chem.* – 2010. – **38**. – P. 265–270.
26. *Gilbert C., Bestman-Smith J., Boivin G.* // *Drug Resist. Updat.* – 2002. – **5**. – P. 88–114.
27. *Korovina A. N., Gus'kova A. A., Skoblov M. et al.* // *Molekuliarnaia Biologiya.* – 2010. – **44**. – P. 488–496.
28. *Schnute M. E., Anderson D. J., Brideau R. J. et al.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – **17**. – P. 3349–3353.
29. *Hwang Y. T., Smith J. F., Gao L., Hwang C. B.* // *Virology.* – 1998. – **246**. – P. 298–305.
30. *Suzutani T., Saijo M., Nagamine M. et al.* // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – **38**. – P. 1839–1844.
31. *Bestman-Smith J., Boivin G.* // *J. Virol.* – 2003. – **77**. – P. 7820–7829.
32. *Matthews J. T., Carroll R. D., Stevens J. T., Haffey M. L.* // *J. Virol.* – 1989. – **63**. – P. 4913–4918.
33. *Matthews J. T., Terry B. J., Field A. K.* // *Antiviral. Res.* – 1993. – **20**. – P. 89–114.

RECOMBINANT HORSERADISH PEROXIDASE FOR ANALYTICAL APPLICATIONS

A. M. EGOROV^{1,2}, V. G. GRIGORENKO^{1*}, I. P. ANDREEVA^{1,3},
M. Yu. RUBTSOVA¹

¹Laboratory of Enzyme Engineering, Chemical Department
of M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

²Microbiology Dept., Russian Medical Academy of Postgraduate
Education, Moscow, Russia;

³Immunotek of MSU, Moscow, Russia

Horseradish peroxidase (HRP) is an important enzyme in bio- and immunochemical analysis. New approaches for functional expression of recombinant HRP in Escherichia coli with new final refolding/reconstitution protocol resulted in spectral and catalytic properties indistinguishable from those of the plant-derived enzyme, opened the prospect of producing a recombinant conjugate of HRP with a marker enzyme for application in immunoassays.

We have for the first time demonstrated the possibility to produce a recombinant conjugate of a protein antigen FABP (fatty acid binding protein) with horseradish peroxidase as marker enzyme for use as tracer in competitive immunoassay for a clinically relevant analyte for early detection of myocardial infarction.

The possibility of using a recombinant, functionally active HRP (as a marker enzyme) conjugated with Fab fragments of the antibody against atrazine was shown for the first time. Recombinant conjugates were successfully produced in the Pichia pastoris methylotrophic yeast expression system in which the Fab fragment of an antibody is bound both to the N- and the C-termini of the marker enzyme. Both these variants manifest immunological and catalytic activity.

Functional expression of recombinant conjugates of HRP with protein antigens and Fab antibody fragments paves the way for broad application of the popular peroxidase marker enzyme in highly sensitive immunobiosensors of a new generation, based on the recombinant DNA technology.

Horseradish peroxidase isoenzyme C (HRP, EC 1.11.1.7), a heme- and Ca²⁺-containing glycoprotein, is a member of the superfamily of plant peroxidases [1–3] that are able to utilize hydrogen peroxide to catalyze the one electron oxidation of a wide variety of organic and

*Correspondence author address: 119991, Leninskie Gory, Chemical Enzymology Division, Chemical Department, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; e-mail: vitaly.grigorenko@gmail.com

inorganic substrates. Whereas plant peroxidases find interest for applications in various biotechnological processes, like bleaching and degradation of organic compounds (e.g. phenols and lignin), HRP specifically is used in analytical biochemistry and biotechnology as a marker enzyme for antibodies, DNA and low molecular mass analytes. Broad substrate specificity and high catalytic activity and stability determined the world-wide application of HRP in bio- and immunosensors, chemiluminescent, fluorescent and electrochemical detection systems, DNA microarrays and biochips with HRP-based colorimetric detection [4–6, 14, 56].

Progress made in peroxidase gene heterologous expression opened up the prospect to study structure–function relationships by means of genetic engineering. The baculovirus expression system allowed production of recombinant HRP in soluble, active and glycosylated form [7], however, this system is laborious and not as widespread as expression in *E. coli*. The expression of HRP in yeast indicated only very low expression of active enzyme [8].

Up to date for the production of wild-type as well as mutant recombinant HRP the *E. coli* expression system is mostly used [9, 10]. Recombinant HRP forms inclusion bodies containing only traces of heme, if expressed in bacterial cytoplasm. Multistep refolding and reactivation of recombinant apo-peroxidase with the prosthetic heme group is complex as the protein contains four disulfide bonds and in addition must bind two Ca^{2+} -ions per molecule. Moreover, the plant-derived enzyme contains 18% carbohydrates via 8 glycosylation sites. Crystal structure of recombinant HRP has been solved, revealing the presence of two domains formed by a total of ten α -helices [11].

Among the factors leading to the formation of inclusion bodies upon expression of cysteine-rich proteins is the reduction potential of *E. coli* cytoplasm, preventing correct formation of disulfide bonds [12]. One solution to this problem was fusion of such a protein to a signal peptide for secretion into the bacterial periplasm. After translocation the signal peptide is cleaved off, and a correctly folded protein with disulfide bonds can be formed under the oxidizing conditions of this compartment. This approach has been successfully applied for the production of soluble active recombinant HRP, though with rather low yield [13].

However, a more effective and reliable way for production of recombinant HRP is desirable in biotechnological applications. The introduction of a C-terminal His-tag facilitated renaturation and purification of recombinant peroxidase from the inclusion bodies are observed. Moreover, by addition of a His-tag to the recombinant peroxidase it was envisaged to facilitate downstream processing, in particular of the dilute solutions obtained after the refolding procedure. The high yield and high specific

activity obtained with the optimized protocol enables to produce sufficient recombinant enzyme for the development of biosensors in which electrons are directly transferred from the electrode to the immobilized peroxidase [4, 6], or in which the sensitivity of the enhanced chemiluminescence reaction is increased [14]. In particular, His-tag recombinant HRP co-adsorbed with corresponding oxidases producing H_2O_2 can be considered as promising for future multienzyme biosensor development [4, 5].

Principal possibility of the development of a mediatorless bienzyme biosensor for peroxide and metabolites, yielding hydrogen peroxide during their transformations, based on co-adsorption and cooperation of HRPhis, capable of efficient direct electron transfer, and the appropriate oxidase, e.g., LysOx, was demonstrated. Amperometric bienzyme biosensor for the determination of L-lysine based on LysOx and HRP containing 6-His tag at the C-terminus physically co-immobilized on the surface of polycrystalline gold electrodes is shown to be simple in manufacturing and operation, sufficiently effective and highly reproducible. The efficient direct electron transfer between gold electrodes and immobilized His-tag HRP makes it possible a mediatorless detection of hydrogen peroxide that is released during the enzymatic oxidation of L-lysine, thus decreasing the number of components in the system used for the detection [4–6].

Genetic engineering approach offers new opportunities for broad application of recombinant HRP to design highly sensitive immunobiosensors of a new generation based on the recombinant DNA technology.

Survey on recombinant conjugates for analytical application

Horseradish peroxidase is a key marker enzyme for immunodiagnostics. Enzyme immunoassays for the detection and quantitative analysis of various substances are based on coupling of marker enzymes like HRP with antigens or antibodies. However, all the chemical conjugation methods result in partial inactivation of the enzyme and heterogeneity of the conjugates, which in turn influence specificity and sensitivity of the assays. With the advance of genetic engineering it became clear that genetic in frame fusions of antigens/antibodies and enzymes would provide many of the desirable features of conjugates for use in immunoassays, in particular homogeneity, 1:1 stoichiometry, reproducibility and ease of production [15].

Early fusion proteins contained the bacterial enzymes β -galactosidase [16–18] or alkaline phosphatase [19–21], which can be easily expressed in *E. coli*. In addition to these enzymes, bioluminescent or fluorescent marker proteins such as aequorin or green fluorescent protein [22, 23] have been used as fusion partners for a model octapeptide. Genetic fusion was also employed to construct conjugates with protein A [24] or an in vitro biotinylated polypeptide tag for β -galactosidase [25]. The genetic approach

is particularly attractive for fusions to small peptides with numerous functional groups, which are difficult to control [26], or with human proteins which often are not easily available [27]. Whereas β -galactosidase is solubly expressed in the cytoplasm, the disulfide-containing alkaline phosphatase is secreted into the periplasm, thus also broadening the spectrum of fusions to disulfide-containing proteins [28, 29]. The drawback of the lower specific activity of the bacterial alkaline phosphatase in comparison to the calf intestinal alkaline phosphatase routinely used in chemical conjugations could be partly overcome by using a genetically engineered mutant of the bacterial enzyme with increased activity [30]. Recombinant conjugates of antibodies with alkaline phosphatase [31–35], luciferase [36], and peroxidase *Arthromyces ramosus* [37] were obtained earlier.

A principal problem associated with β -galactosidase or alkaline phosphatase fusions is their tetrameric and dimeric structure, respectively, which likely leads to an increased apparent affinity (avidity) of a conjugate in comparison to the free antigen. This is undesirable for the development of competitive immunoassays. On the other hand, horseradish peroxidase, which is very popular for preparation of enzyme-conjugates [38], can only be expressed in *E. coli* in the form of inclusion bodies. The yield of refolded and reconstituted (with heme) recombinant peroxidase used to be rather low [9, 10], which has so far precluded the use of this enzyme in the genetic fusion approach. Progress in heterologous expression in *E. coli* and reactivation of recombinant HRP carrying a C-terminal oligo-histidine tag (HRP_{his}) [13] opened the prospect of producing a recombinant conjugate of HRP_{his} with a marker enzyme for application in immunoassays.

Recombinant conjugates of HRP with protein antigens

Earlier we have exemplified that a fusion protein of peroxidase and human heart fatty acid binding protein (H-FABP) can be used as a recombinant tracer in immunoassays for detection of H-FABP [39]. This small (15 kDa) cytosolic protein is a member of the protein family specialized in transport of fatty acids and is highly abundant in heart muscle (0.52 mg/g heart tissue). Its rapid release into the circulation and its good tissue specificity make it an ideal early marker for clinical diagnosis of acute myocardial infarction [27, 40].

A fusion protein comprising HRP and human heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) was constructed by introducing the coding part of the human H FABP cDNA into the *Xma*III site of the expression vector for horseradish peroxidase, *pETHRPhis* [13], just in front of the 6xHis tag (Fig. 1).

Recombinant HRP-FABP_{his} conjugate has the same Soret band absorption with a maximum at 403 nm as native peroxidase and recombinant

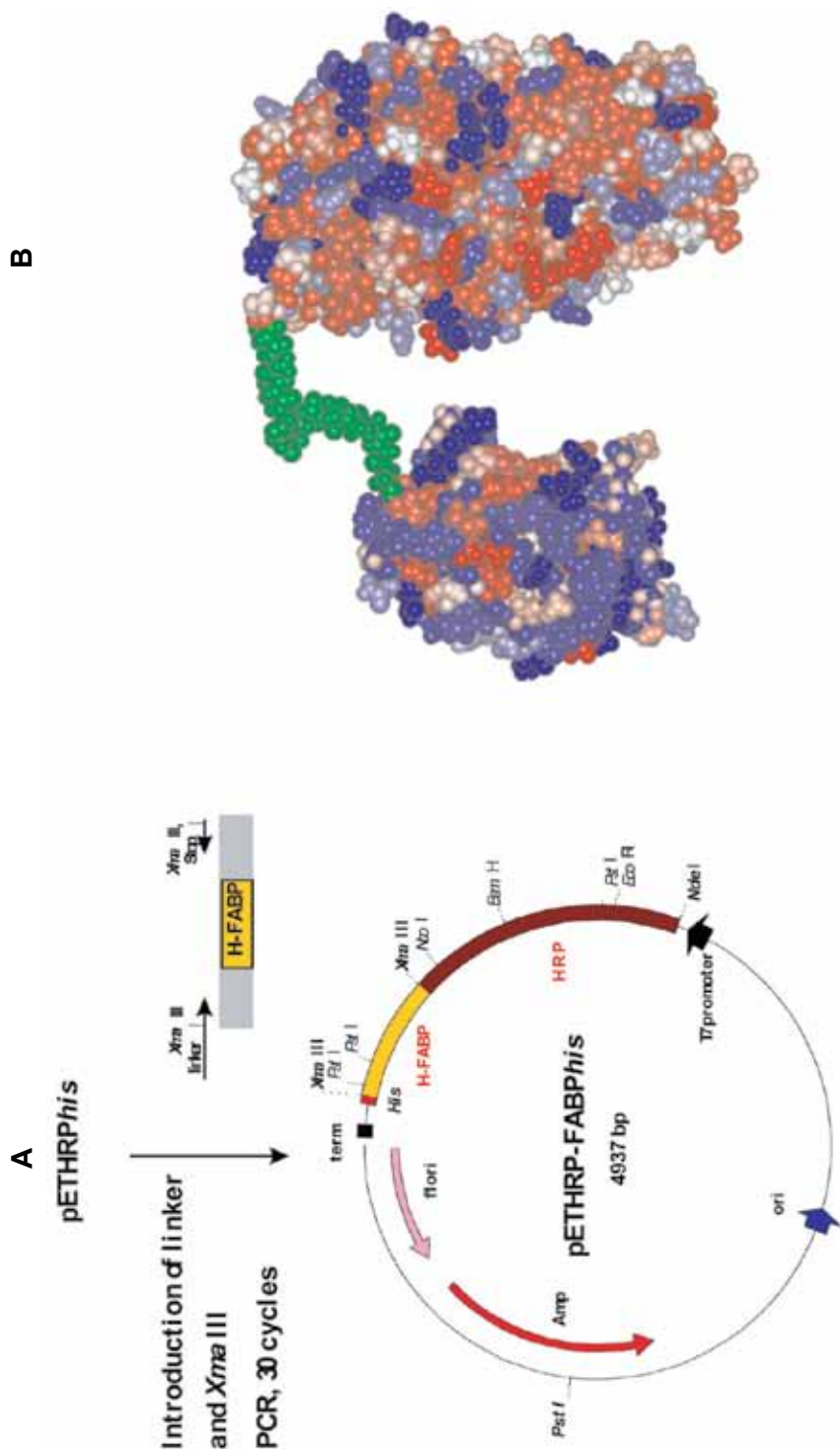


Fig. 1. Cloning scheme (A) and spatial model (B) of HRP-FABP conjugate

HRPhis, indicating that the Fe^{3+} coordination by heme as well as proximal and distal histidines is not affected. These data indicate that C-terminal extension of the recombinant peroxidase with the 15 kDa human H-FABP has no drastic influence on the activity of the recombinant conjugate, which values correspond to that for recombinant HRPhis alone and the plant-derived enzyme (1000 U/mg against ABTS substrate) [13]. At the same time the recombinant conjugate bound fatty acids as shown qualitatively by a gel elution assay with radioactive oleic acid (data not shown) and was recognized by a sandwich ELISA with two monoclonal antibodies [27] indicating the structural integrity of the FABP part.

The competitive assay format with its reduced number of incubations can be successfully employed to develop fast immunoassays. Solid phase immunoassay is based on competition of free H-FABP with HRP-FABP conjugate for binding sites on microtiter plates coated with polyclonal antibodies against H-FABP. A conjugate of plant peroxidase and human H-FABP has been synthesized based on periodate oxidation of oligosaccharides [41].

The typical calibration curves shown in Fig. 2 demonstrate the wide measuring range (3 orders of magnitude of H-FABP concentration) and good detection limit – 1.5 ng H-FABP per ml of sample (0.05 ng/well). The intraassay variation coefficient was between 4 and 8% [39]. The detection limit of this new immunoassay is similar to that observed with

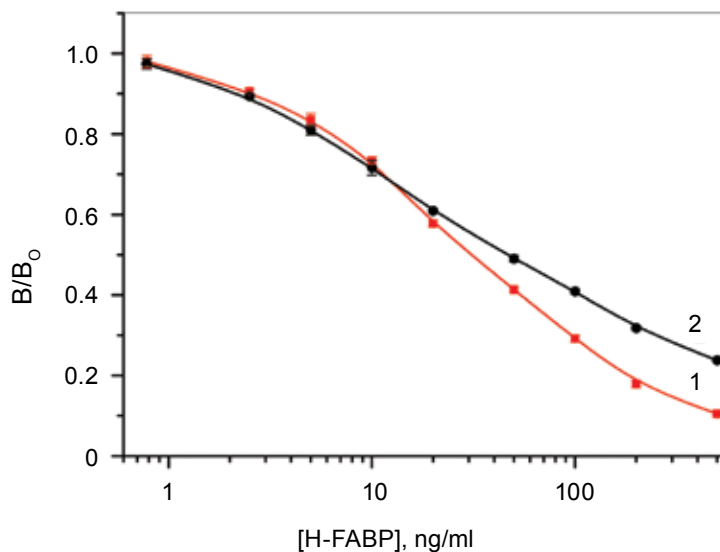


Fig. 2. Calibration curves for the competitive immunoassay. Competition of 1 – recombinant (-■-) or 2 – chemically prepared conjugate (-●-) with H-FABP

sandwich-type ELISAs, using monoclonal antibodies against human H-FABP (0.02–0.1 ng/well) [27, 40]. Interestingly, at higher concentrations H-FABP competed better with the recombinant conjugate than with chemically prepared conjugate for binding to the polyclonal capture antibodies. One explanation could be the presence of chemically prepared conjugate consisting of HRP with more than one H-FABP attached, which would exhibit a higher apparent affinity due to multipoint binding to the immobilized antibodies.

To challenge the competitive ELISA we analyzed a set of plasma samples periodically withdrawn from one patient with diagnosis of AMI over a period of 24 h after admission to the hospital (Fig. 3) [39]. The values for H-FABP concentrations in the plasma samples assayed with the competitive ELISA exhibited good correlation with those obtained by the reference sandwich ELISA and the developed EUROCARDI immunosensor [27, 40].

Thus we have opened up for the first time the possibility to reproducibly produce a recombinant conjugate of a protein antigen with horseradish peroxidase as marker enzyme for use as tracer in competitive immunoassays [39]. The applicability of this genetically engineered fusion protein with a defined 1 : 1 stoichiometry for a clinically relevant analyte, the human heart fatty acid binding protein, has been shown with plasma from a

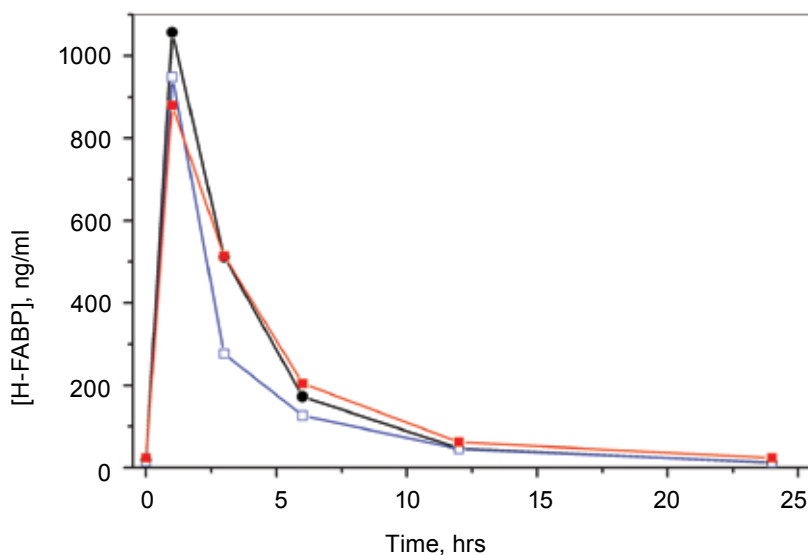


Fig. 3. Comparison of FABP plasma concentration, obtained with different immunoassay formats. Profile of patient No. 14: ●- sandwich ELISA, □- electrochemical immunosensor, ■- competitive ELISA

patient after myocardial infarction. Our approach paves the way for broad application of the popular peroxidase marker enzyme in competitive immunoassays employing genetically engineered conjugates. We have already extended the concept by preparation of a recombinant conjugate of peroxidase and human myoglobin, another analyte important for early detection of myocardial infarction.

Recombinant conjugates of HRP with (Fab) antibodies fragments

The functional expression of the recombinant conjugate of HRP and antibody fragments in *E. coli* is associated with a number of difficulties, since there is no post-translational glycosylation of proteins in *E. coli* cells, resulting in low solubility and aggregation of the resulting protein. This problem can be solved by replacing the expression system. For instance, it has been shown that methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is a more suitable medium for antibody expression than *E. coli* cells [42, 43].

HRP [44] and antibody fragments [45] were successfully expressed individually in *P. pastoris* cells, both in the single-stranded form scFv [46, 47] and in a Fab form [48]. Moreover, certain immune conjugates have also been created using this expression system [49–51]. It has been demonstrated that gene expression in the *Pichia pastoris* system in the secreted form considerably simplifies the scaling of the process for biochemical applications [52].

Progress in functional secreted expression of HRP and antibodies in *Pichia pastoris* [44, 53] open the prospect to produce recombinant conjugates of HRP with antibodies for application in immunoassays. However, the production of recombinant conjugates is an appreciably complicated task, since it remains thus far impossible to reliably predict the structure of the desired conjugate; hence, loss of the functional activity of both the marker enzyme and antigen is possible, due to the incorrect folding of two components.

General versatile expression system for recombinant conjugates of peroxidase with Fab fragments of antibodies production has been elaborated based on *pPICZalpha* vector and X33 *P. pastoris* strain (*Invitrogen*). These systems provide secreted, methanol-inducible expression in cultural medium of two types of conjugates where the peroxidase part genetically fused to N- or C-terminal part of variable heavy chain of antibody via short flexible linker sequences (*Gly₄Ser*) (Fig. 4) [54].

To exemplify the applicability of this approach for the first time we have produced a set of conjugates of peroxidase with Fab against atrazine pesticides (Fig. 4).

The developed expression vectors allow simple recloning of any variable heavy (*PstI/BstEII sites*) and light (*BamHI/XhoI sites*) chains, thus

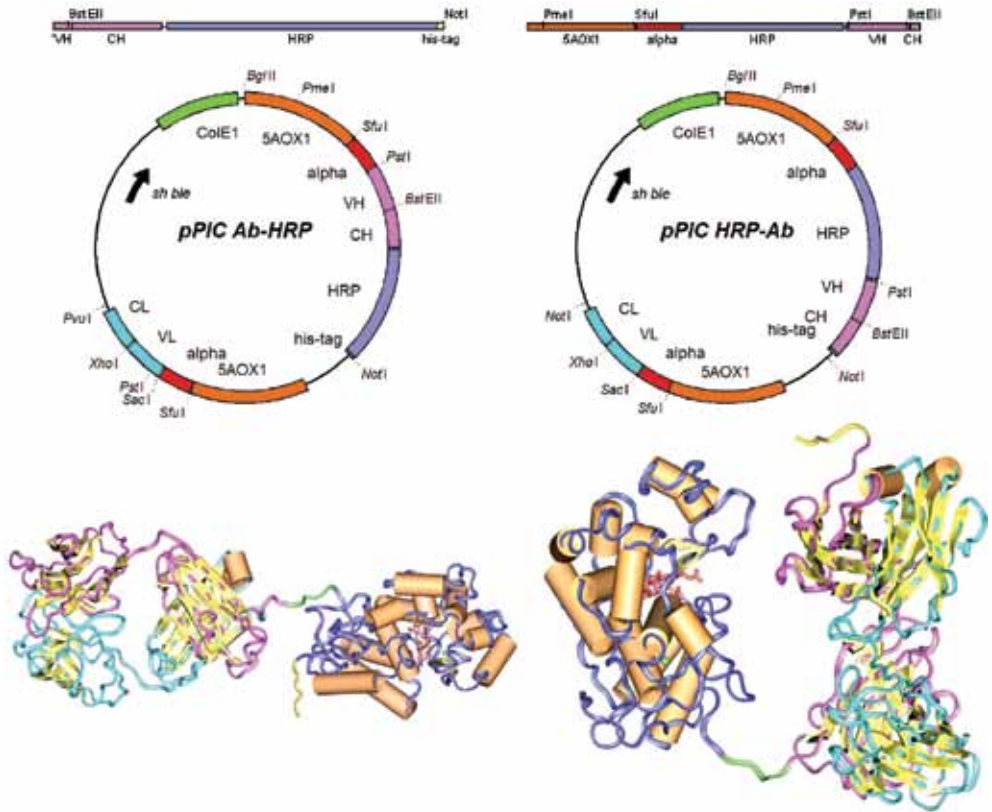


Fig. 4. Cloning schemes and spatial models of recombinant conjugates: Fab-HRP and HRP-Fab (left and right panel respectively)

providing general vectors for recombinant conjugates of peroxidase with antibodies production in *P. pastoris*.

The total yield of recombinant conjugates was approximately 3-10 mg per 1 l of the *P. pastoris* culture supernatant. A relatively low yield of secreted conjugates correlates with the yield upon expression of the *HRP* gene only [54]. We believe that one of the factors that have a negative effect on the yield of the secreted product is the excessive glycosylation of the peroxidase component of the conjugate, which is typical of *P. pastoris* cells. In order to verify this hypothesis, it may be reasonable to remove all N-glycosylation sites in HRP or replace HRP with another reporter protein, such as EGFP.

In order to confirm the antigen-binding activity of recombinant conjugates, we selected the scheme of indirect competitive single-stage ELISA carried out on the wells with an immobilized atrazine-BSA conjugate. The

data obtained attest to the presence of both catalytic and antibody activity in all forms. However, the low activity of the HRP-Fab in comparison with the C-terminal conjugate Fab-HRP may attest to the fact that the mutual spatial arrangement of two components of the chimeric protein in this case results in a decrease in the catalytic activity of peroxidase. Typical calibration curve (Fig. 5) allows one to determine the atrazine concentration over a wide range, from 0.1 to 50 ng/ml; the variation coefficient being no higher than 8%. IC_{50} is equal to 3 ng/ml, which agrees well with the results of atrazine determination by a two-stage ELISA procedure, using recombinant Fab fragments of the same antibody K411B [54] and with the data on the single-stranded mini-antibody (scFv) obtained earlier in *E. coli* [53, 55]. Thus, the recombinant conjugates of peroxidase with Fab fragments of antibody against atrazine obtained in the present study possess functional activity and can be used to determine atrazine via ELISA.

We have first demonstrated the possibility to produce a fully active recombinant conjugate of a protein antigen with horseradish peroxidase as marker enzyme for use as tracer in competitive immunoassay for a clinically relevant analyte. We have already extended the concept by preparation of a recombinant conjugate of peroxidase and human myoglobin, another analyte important for early detection of myocardial infarction.

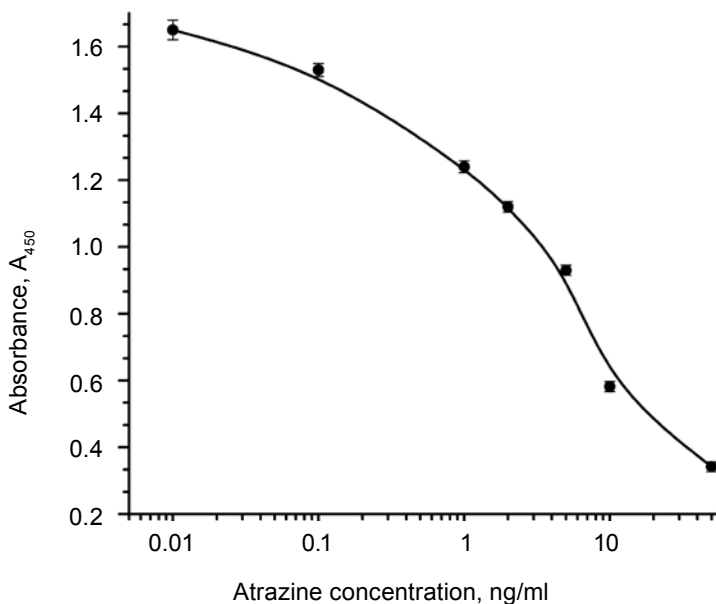


Fig. 5. Calibration curve for atrazine determination in competitive ELISA with recombinant conjugate of Fab-HRP

The possibility of using a recombinant, functionally active HRP (as a marker enzyme) conjugated with Fab fragments of the antibody against atrazine was shown for the first time. Recombinant conjugates were obtained in which the Fab fragment of an antibody is bound both to the N- and the C-terminus of peroxidase. Both these variants manifest immunological and catalytic activity.

Thus successful genetic engineering towards horseradish peroxidase opens new opportunities of using this traditional marker enzyme for analytical and biomedical application.

References

1. *Chance B.* // Arch. Biochem. – 1949. – **22**, N 2. – P. 224–252.
2. *Dunford H. B., Stillman J. S.* // Coord. Chem. Rev. – 1976. – **19**. – P. 187–251.
3. *Welinder K. G.* // Eur. J. Biochem. – 1979. – **96**. – P. 483–502.
4. *Ferapontova E. E., Grigorenko V. G., Egorov A. M. et al.* // J. Electroanal. Chem. – 2001. – **509**, N 1. – P. 19–26.
5. *Ferapontova E. E., Grigorenko V. G., Egorov A. M. et al.* // Biosens. Bioelectron. – 2001. – **16**, N 3. – P. 147–157.
6. *Presnova G., Grigorenko V., Egorov A. et al.* // Faraday Discuss. – 2000. – **116**. – P. 281–289.
7. *Hartmann C., Ortiz de Montellano P. R.* // Arch. Biochem. Biophys. – 1992. – **297**. – P. 61–72.
8. *Vlamiš-Gardikas A., Smith A. T., Clements J. M., Burke J. F.* // Biochem. Soc. Trans. – 1992. – **20**, N 2. – P. 111S.
9. *Smith A. T., Santana N., Dacey S. et al.* // J. Biol. Chem. – 1990. – **265**. – P. 13335–13343.
10. *Egorov A. M., Gazaryan I. G., Kim B. B. et al.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1994. – **721**. – P. 73–82.
11. *Gajhede M., Schuller D. J., Henriksen A. et al.* // Nat. Struct. Biol. – 1997. – **4**, N 12. – P. 1032–1038.
12. *Freedman R. B.* // Curr. Opin. Struct. Biol. – 1995. – **5**, N 1. – P. 85–91.
13. *Grigorenko V., Chubar T., Kapeliuch Yu. et al.* // Biocatal. Biotransform. – 1999. – **17**. – P. 359–397.
14. *Rubtsova M. Y., Kovba G. V., Egorov A. M.* // Biosens. Bioelectron. – 1998. – **13**, N 1. – P. 75–85.
15. *Lindbladh C., Mosbach K., Bulow L.* // Trends Biochem. Sci. – 1993. – **8**. – P. 279–283.
16. *Porstman T., Kiessig S. T.* // J. Immunol. Methods. – 1992. – **150**. – P. 5–21.
17. *Offensperger W., Wahl S., Neurath A. R. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1985. – **82**. – P. 7540–7544.
18. *Peterhans A., Mecklenburg M., Meusdoerffer F., Mosbach K.* // Anal. Biochem. – 1987. – **163**. – P. 470–475.
19. *Lindbladh C., Persson M., Bulow L. et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1987. – **149**. – P. 607–614.

20. Gillet D., Ezan E., Ducancel F. et al. // *Anal. Chem.* – 1993. – **65**. – P. 1779–1784.
21. Ezan E., Ducancel F., Gillet D. et al. // *J. Immunol. Methods* – 1994. – **169**. – P. 205–211.
22. Ramanathan S., Lewis J. C., Kindy M. S., Daunert S. // *Anal. Chim. Acta.* – 1998. – **369**. – P. 181–188.
23. Lewis J. C., Daunert S. // *Anal. Chem.* – 1999. – **71**. – P. 4321–4327.
24. Lindbladh C., Mosbach K., Bulow L. // *J. Immunol. Methods.* – 1991. – **137**. – P. 199–207.
25. Wittkowski A., Kindy M. S., Daunert S., Bachas L. G. // *Anal. Chem.* – 1995. – **67**. – P. 1301–1306.
26. Wittkowski A., Daunert S., Kindy M. S., Bachas L. G. // *Anal. Chem.* – 1993. – **65**. – P. 1147–1151.
27. Schreiber A., Specht B., Pelsers M. M. A. L. et al. // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 1998. – **36**. – P. 283–288.
28. Gillet D., Ducancel F., Pradel E. et al. // *Protein Eng.* – 1992. – **5**. – P. 273–278.
29. Chanussot C., Bellanger L., Ligny-Lemaire C. et al. // *Immunol. Methods.* – 1996. – **197**. – P. 39–49.
30. Kerschbaumer R. J., Hirschl S., Schwager C. et al. // *Immunotechnology.* – 1996. – **2**. – P. 145–150.
31. Rau D., Kramer K., Hock B. // *J. Immunoassay Immunochem.* – 2002. – **23**, N 2. – P. 129–143.
32. Tachibana H., Takekoshi M., Cheng X. J. et al. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2004. – **11**, N 1. – P. 216–218.
33. Mousli M., Turki I., Kharmachi H. et al. // *J. Virol. Meth.* – 2007. – **146**, N 1–2. – P. 246–256.
34. Dong J. X., Li Z. F., Lei H. T. et al. // *Anal. Chim. Acta.* – 2012. – **736**. – P. 85–91.
35. Xu Z. L., Dong J. X., Wang H. et al. // *J. Agric. Food Chem.* – 2012. – **60**, N 20. – P. 5076–5083.
36. Patel K. G., Ng P. P., Kuo C. C. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – **390**, N 3. – P. 971–976.
37. Joosten V., Roelofs M. S., van den Dries N. et al. // *J. Biotechnol.* – 2005. – **120**, N 4. – P. 347–359.
38. Markaryan A. N., Mashko S. V., Kukel L. V. et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1991. – **646**. – P. 125–135.
39. Grigorenko V., Andreeva I., Borchers T. et al. // *Anal. Chem.* – 2001. – **73**, N 6. – P. 1134–1139.
40. Wodzig K. W. H., Pelsers M. M. A. L., van der Vusse G. J. et al. // *Ann. Clin. Biochem.* – 1997. – **34**. – P. 263–268.
41. Nakane P. K., Kawaoi A. // *J. Histochem. Cytochem.* – 1974. – **22**. – P. 1084–1091.
42. Robin S., Petrov K., Dintinger T. et al. // *Mol. Immunol.* – 2003. – **39**, N 12. – P. 729–738.

43. *Cupit P. M., Whyte J. A., Porter A. J. et al.* // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1999. – **29**, N 5. – P. 273–277.
44. *Morawski B., Lin Z., Cirino P. et al.* // *Protein Eng.* – 2000 – **13**, N 5. – P. 377–384.
45. *Pennell C. A., Eldin P.* // *Res. Immunol.* – 1998. – **149**, N 6. – P. 599–603.
46. *Fischer R., Drossard J., Emans N. et al.* // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1999. – **30**, Pt 2. – P. 112–117.
47. *Freyre F. M., Vazquez J. E., Ayala M. et al.* // *J. Biotechnol.* – 2000. – **76**, N 2–3. – P. 157–163.
48. *Takahashi K., Yuuki T., Takai T. et al.* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2000. – **64**, N 10. – P. 2138–2144.
49. *Andrade E. V., Albuquerque F. C., Moraes L. M. et al.* // *J. Biochem. (Tokyo).* – 2000. – **128**, N 6. – P. 891–895.
50. *Luo D., Geng M., Schultes B. et al.* // *J. Biotechnol.* – 1998. – **65**, № 2–3. – P. 225–228.
51. *Powers D. B., Amersdorfer P., Poul M. et al.* // *J. Immunol. Meth.* – 2001. – **251**, N 1–2. – P. 123–135.
52. *Hellwig S., Emde F., Raven N. P. et al.* // *Biotechnol. Bioeng.* – 2001. – **74**, N 4. – P. 344–352.
53. *Lange S., Schmitt J., Schmid R. D.* // *J. Immunol. Methods.* – 2001. – **255**. – P. 103–114.
54. *Koliasnikov O. V., Grigorenko V. G., Egorov A. M. et al.* // *Acta Naturae.* – 2011. – **3**, N 10. – P. 85–92.
55. *Kramer K., Hock B.* // *Food Agric. Immunol.* – 1996. – **8**. – P. 97–109.
56. *Rubtsova M. Yu., Ulyashova M. M., Edelstein M. V., Egorov A. M.* // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – **26**, N 4. – P. 1252–1260.

MODERN TECHNIQUES OF IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS: INTEGRATION OF SENSITIVITY AND RAPIDITY

B. B. DZANTIEV, A. E. URUSOV, A. V. ZHERDEV

*A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy
of Sciences, Moscow, Russia*

The review considers current trends in the development of immuno-analytical systems. The focus is on new methodological solutions that will significantly reduce the analysis time (up to 5-15 minutes), keeping low detection limit. Such approaches as application of new markers, rapid separation of immune complexes, generation of signals by spatial closing of immunoreagents are characterized. Basing on specific requirements to the analytical methods in modern society, the most promising areas of the immunoassay development are evaluated.

1. Potential and advantages of antibodies as bioanalytical receptors

In the course of accumulation of knowledge about antigen-antibody interaction as highly affine and highly specific reaction an interest to antibodies as the means for the detection of antigens of various chemical nature was growing. The history of immunoassay started from immune precipitating methods, in which after extended incubations visually detectable insoluble antigen-antibody aggregates were formed. There is the important possibility to carry out the immunoprecipitation with the use of unfractionated antisera, containing antibodies to a defined compound, and various samples without their pre-processing (except for very turbid mediums). Such procedural simplicity, the initial reason of which was the absence of tools for more sensitive detection of immune complex, provided high viability of this approach, applied till the moment for the assay of many proteins and determination of blood-group specificity [1]. Maximal reduction of the determination duration was not demanded from immune precipitation; obtaining of the results of clinical test in 1-2 days after sampling was perceived as a norm several decades ago. More continuing incubation was not observed as a disadvantage of the procedure, but as a definite guarantee of greater reliability and reproducibility of the results due to achievement of final (equilibrium) stage by the immune-precipitating processes.

An important, revolutionary progress within the development of immunoassay was the occurrence of analytical systems, in which one of implemented immune reagents was the complex with a marker, detected in extremely low concentrations. In the beginning of the 1950's such pro-

cedure was fulfilled for radio-active isotopic tags by Yalow and Berson [2], who were awarded the Nobel Prize for this development in 1977. A bit later the methods started developing with the use as the tags of enzymes, fluorophors, other compounds. New systems of detection were actively described, allowing to detect various compounds in the concentrations up to 10^{-10} – 10^{-12} M in several hours. Transfer to non-isotopic tags excluded the need in special equipment and safety measures and thus called even more wide spread of immune-diagnostics. The main area of its implementation was and remains to be medicine, which greatly exceeds in the scopes of commercialization the ecological monitoring, control of quality and safety of food products and agricultural raw materials, other areas, in which immunoassay is also actively used.

In recent years many researchers have suggested to use in the analysis other receptor molecules as an alternative to antibodies. On the one hand, these are natural agents with similar recombination of structural elements of a molecule and possibility of obtaining millions of its variants with different specificity [3–5]. On the other hand – synthetic compounds, in which a mark of an analyte is created artificially, providing the possibility of its selective detection [6, 7–10]. Nevertheless, antibodies remain to be and in the near future, probably shall remain to be the receptor, the most widely implemented for specific detection and quantification of content of the compounds of various nature [11]. It is conditioned to a great extent by a significant “allowance”, which was obtained by antibodies as a result of their active use for decades. At the moment there are commercially available antibodies to dozens of thousands of compounds of practical importance. The approaches were developed, which allow obtaining antibodies to the agents, which traditionally were not observed as inducers of immune response – ions of heavy metals [12–14], carbon nanoparticles [15, 16], vitamins [17], highly toxic compounds [18]. The technologies of obtaining of hybrids and display libraries allow us to perform the rapid screening and selection of antibodies with necessary specificity, and then producing of the given antibodies in unlimited quantities [19, 20]. Affinity and specificity of antibodies can be purposefully changed with the use of the methods of gene engineering, which lately have been intensively implemented for molecular design of antigen-binding sites of antibodies [21, 22]. The procedures of conjugation of antibodies with various markers were developed, combining high product output and high level of preservation of its functional properties [23].

2. Modern requirements to immunoanalytical methods

However, although we may give a unique reply to the question of choosing the bioreceptor element, the situation with the choice of the ana-

lytical method is much more complicated. Now, enzymes, fluorophores, liposomes, co-factors, various nanoparticles, etc. are used as the labels in immunoassay (in commercial tests and in the developments recommended to be introduced into practice). The analysis is performed in the volume of a solution, at the surface of polystyrene plates, electrodes, in flow-through cells, membrane pores, etc. Formation of immune complexes is registered by photometric, fluorometric, amperometric, potentiometric, gravimetric, magnetic detectors, etc. By this each of these “etc.” – are the dozens of more rare variants, representing, nevertheless, interest for researchers.

What is the ground for such variety and is it needed? Should we choose one, the best at the moment method, and use exactly it to determine various antigens and to decide various practical tasks? Will such decision simplify the demands to equipment and reagents, skills of specialists, interpretation of obtained outcomes. Unfortunately or luckily, but such unification appears to be possible. Immunochemical methods are used to fulfill various tasks, differing in practical requirements. On the one hand, these are tests, performed in specialized, stationary laboratories, from which the maximum sensitivity and reliability are expected, but the range of several hours between sampling and obtaining of the assay results is pretty acceptable. On the other hand, in a significant number of cases it is required rapid, for minutes, obtaining of the information directly at the site of sampling (at the site of the primary screening medical examination, by attending of a doctor of the patient in house, in case of self-control of the patient, at examination of natural and industrial objects). These two niches of immunoassay at the moment are successfully filled with various analytical methods.

The task of reliable highly sensitive diagnostics is solved by enzyme-linked immunosorbent assay, immune-fluorescent assay, radio-immune assay – heterogeneous methods, based on continuing (dozens of minutes or hours) incubations of reagents till achievement by immunochemical reaction of equilibrium condition, separation of bound and non-bound components and high-sensitive quantitative registration of corresponding markers in the set of immune complexes.

An alternative approach is the performance of homogenous immunochemical reactions, achieving equilibrium in minutes, and direct detection on this or that parameters of content in a reaction medium of created immune complexes. To this group we should assign immune-analytical systems, based on modulations of activities of the enzyme marker [24], changing of polarization of a fluorescent marker [25], registration of immunochemical complexes on changing of optical properties of the medium (nephelometry) [26], etc. Due to the absence of the stage of reagents separation and corresponding influence on registered signal of components of

samples (the so-called matrix effect) and non-reacted immunoreagents, and as well as due to relatively low sensitivity (in comparison with the registration of markers on heterogeneous immunoassays) the given analytical methods are generally characterized by sufficiently higher limits of detection. Initially they were also developed as the methods for stationary laboratories, but development of technologies and miniaturization of the blocks of data processing allowed suggesting the number of portable mobile systems, suitable for field tests (first of all – for the registration of polarization of fluorescence) [27].

The membrane immunochromatographic test-systems (test-strips) [28–30] should be also assigned to the test-systems for rapid screening with low sensitivity. Rapidness of detection is assured by the use of homogenous (in the volume of flowing on test-strip fluid) and rapid heterogeneous (in micro-volumes of membrane pores) interactions, and immunoreagents are conjugated with coloured ultradisperse markers (colloidal gold, latexes, etc.) for rapid direct detection [31, 32].

So, the modern situation in immune diagnostics is characterized by some established “division of duties” between relatively long (hours) analytical methods with low limit of detection and rapid (minutes) methods, defining sufficiently higher concentrations of target compound, and in the number of cases – representing only qualitative information that its content in the sample is higher than a definite limit. Each of these classes of methods is well adapted for its special tasks, and its practical use is supported by developed technologies on production of corresponding test-systems, presence of serial equipment for assaying and final measurements, informing and professional training of specialists – users of the developed test-systems.

Nevertheless, the established situation should not be considered as a final optimal solution. The wish to combine the benefits of the given approaches and to suggest immuneanalytical systems, comprising high sensitivity and rapidness of detection is natural. In the present review we shall observe the developments held in this area in recent years. Figure 1 summarizes the existing variety of approaches, targeted at the improvement of characteristics of immunoanalytical systems.

3. Methods of reduction of detection limit in immunoassays

The achievement of a low limit of detection of immunoassay demands the combination of high-affine interaction of antibodies with corresponding antigens and the potential of marker detection (or a parameter, accompanying formation of the immune complex) in extremely low concentrations.

In 1986 Jackson and Ekins [33] held theoretic comparison of non-competitive and competitive immunoassays in the notions of sensitivity,

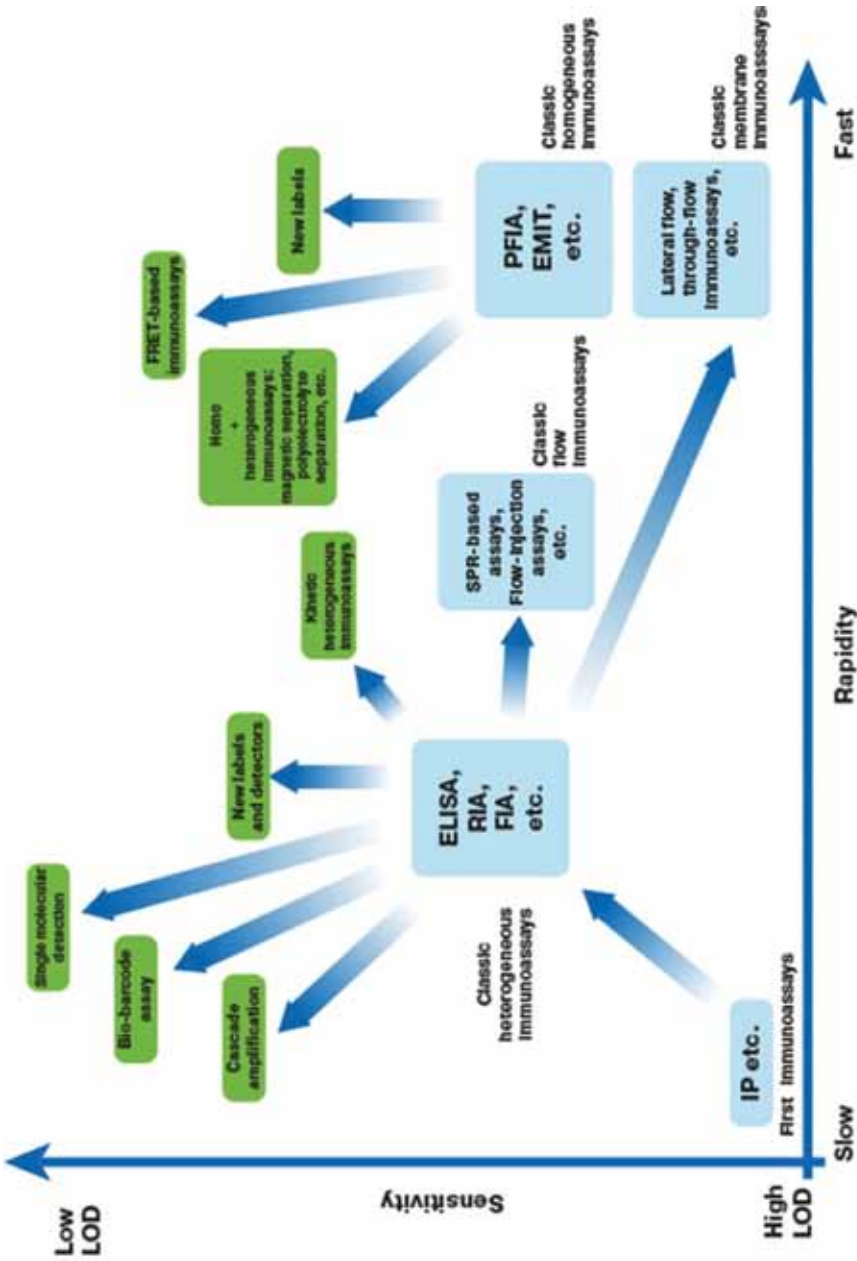


Fig. 1. Variety and evolution of immunoassays. Abbreviations: IP – immunoprecipitation, ELISA – enzyme linked immunosorbent assay, RIA – radioimmunoassay, FIA – fluorescent immunoassay, PFIA – polarization fluorescence immunoassay, EMIT – enzyme multiplied immunotechnique, SPR – surface Plasmon resonance

precision, kinetics and working range of analyte. They defined theoretic limits of detection of these methods, their connection with the characteristics of antibodies.

It is worth noting, that the peculiarity of dependence between the binding constant of immunochemical reaction and the limit of detection of the target antigen depends significantly on the accomplished format of the immunoassay – non-competitive or competitive. In the first case the antigen is detected directly in the process of immune complex formation, the way it is happening, for example, in a sandwich format of the analysis with formation of complexes antibody – antigen – labelled antigen. In the second case a competition between the antigen in a sample and the second antigenic agent for binding with antibodies is registered. For non-competitive analysis it is potentially possible to detect extremely small concentrations of antigen, if it is allowed by the sensitivity of marker detection or direct detection of immune complex, as well as low background signal. There is a number of works, describing the possibility to detect a single antigen molecule with these sources of signal strengthening [34, 35].

A significant role is played by the optimization of the ratio of reagents used. It should assure, on the one hand, a minimal limit of detection, and on the other hand – maximum reliability and (for quantitative methods) precision of analysis. These requirements cannot be performed simultaneously and demand definite compromise solutions. For the formats of analyses with direct dependence between the concentration of antigen and the number of detected markers (such as a sandwich scheme) the increase of concentration of immune reagents enhances the number of detected complexes. However this increase may be accompanied by the growth of non-specific (background) binding of markers. For competitive analysis with reverse dependence between the concentration of analyte and the number of detected markers the reduction of the limit of detection is assured by low concentrations of immunoreagents [36], but it is accompanied by low amplitude of signal and low precision of determination [37].

Despite doubtless importance of affinity of immune interaction for high sensitive assay, it should not be suggested that its growth to infinity shall assure unlimited lowering of the detection limit. In this case the issue about minimal detected concentration of a marker becomes critical. Nevertheless, for modern practice the choice of the most affine antibodies from the variety of available ones allows reducing significantly the detection limit, achieving subnanogram levels in the number of cases [38].

Traditionally immunologists note the existence of natural limits on affinity of complex-formation of antibodies for antigens, defined by the nature of induction of immune response. This is connected with the fact that for antibodies with the kinetic constant of dissociation of the order

10^{-4} sec^{-1} and less the time of half-life of the complex of antigen with B-cell receptor becomes greater, than the time of endocytosis of this complex. Respectfully, further increase of the time of half-life of the complex already does not assist B-cell proliferation [39]. Maximum value of the kinetic constant of association is defined by the speed of diffusion of immunoreagents in the solution. In this respect for the antibodies of IgG class, specific for protein antigens, the equilibrium constant of association usually does not exceed 10^{10} M^{-1} [40]. However, these limitations do not exclude the possibility of that, a significantly higher level of complementarity with antigen-binding site of antibodies, and correspondently, a higher constant value of binding is achieved for some antigens. There is also a number of works describing non-dissociating complexes of antigen-antibody with infinite affinity [9, 10]. Another way to increase the affinity of immune interaction, successfully fulfilled in the number of recent developments, is the targeted design of antigen-binding parts of recombinant antibodies [41–43].

So, in a non-competitive analysis the use of high sensitive ways of registration of immune complexes or bound markers can potentially lead

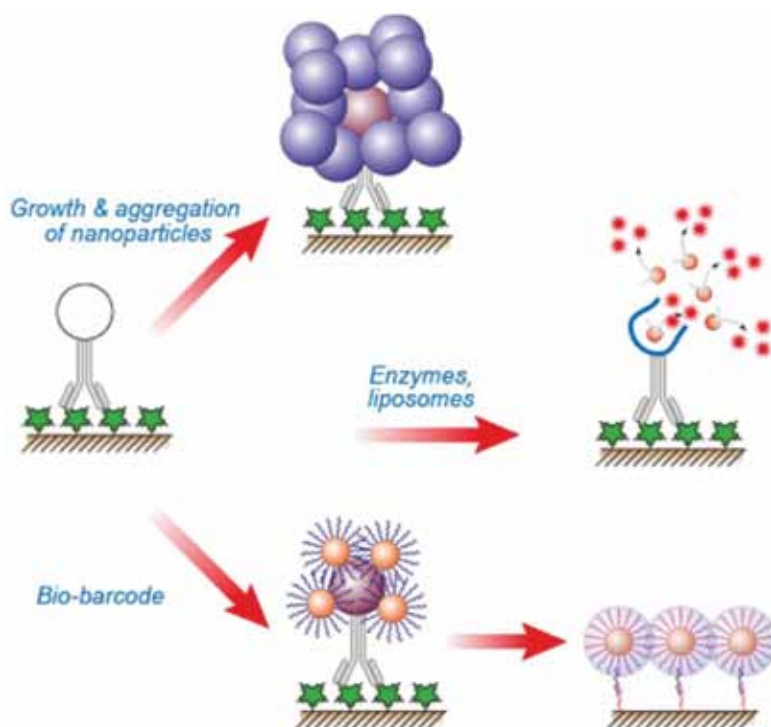


Fig. 2. Approches for signal amplification in immunoassays

to significant lowering of the detection limit (Fig. 2). For example, the systems of cascade amplification of a signal in immunoassay are developed actively, in which a marker bound with immune complex marker after separation of the reaction mixture components acts as the inducer of formation of the great number of molecules, which are detected at the final stage of the test. (The simple variant of such cascade is a traditional ELISA, which detects not molecule of enzyme bound with the antigen-antibody complex as it is, but the products of catalyzed reaction). Although theoretically such cascade or several cascades can significantly reduce the detection limit, the restrictor for this approach is non-specific binding, resulting in the increase of the background signal. Nevertheless, there is a number of developments in which strengthening of the signal assures detection of single molecules of antigen. For example, to reach this target the formation of micro-dispersive colloidal complexes can be used on the ground of a single molecule of a marker [44].

Highly sensitive assays may be also realized by PCR amplification of target nucleotide sequences [45–47]. The given nucleic acid lateral flow immunoassay allows detecting a few bacterial cells in grams of tested samples [45].

It is evident that the limit of detection shall always be worse than the theoretically possible one, since not only registration of some signal is necessary, but also confirmation of difference of its level from non-specific interaction in the analytical system.

4. The ways of improvement of analytical characteristics of heterogeneous immunoassays

First of all, the sensitive heterogeneous immunoassay does not necessarily demand the incubation of reagents till achievement of chemical equilibrium [48]. The simplest solution, which does not demand the changes of reagent bases and the means of detection is the reduction of duration of the assay stages. Traditionally recommended prolonged stages of ELISA (an hour and more for each immune stage) improve first of all reproducibility and precision of the assay. In a number of cases it is demonstrated, that incubation duration can be reduced to 10–15 minutes with not very big reduction of amplitude of detected signal and almost without alteration of the assay operating range [49, 50]. In accomplishment of kinetic assay its reproducibility starts to play important role, demanding, for example, strict match of the times of incubation for all samples of tested series. However, modern means of automation [51], used in a number of immune enzyme analyzers, allow fulfilling this task. Regarding heterogeneous immunoassays it should be considered that the reason for their extended duration is not heterogeneity of interaction (between reagents presenting in the solu-

tion and immobilized at the surface of carrier), but slow diffusion-controlled processes of establishing of equilibrium between the layers of fluid, locating at different distances from a carrier. Considering this, promising are the developments, in which this diffusion exchange is significantly accelerated and reagent medium is structured in the way that time losses due to diffusion become insignificant.

For mixing of pre-surface layers and the total volume of fluid ultrasound processing recommended itself well for a number of test-systems demonstrating 2-5-fold reduction of the analysis duration [52].

An effective solution of the problem of diffusion limitations is the transfer of interactions in microvolumes, which is possible with the use of highly sensitive systems of detections of markers (for example, modern fluorescent detectors) [53–55]. Such miniaturization is used in many developed immunochips. Immunoassay at a chip on sequence of stages matches classic solid-phase immunoassay. The principle difference is that the antibody monolayer is immobilized at the surface of silicon, quartz or polymeric materials (Teflon, polycarbonate) [56] of about $100 \mu\text{m}^2$ in the area. To compare – the area of only a bottom of the well of a standard 96-well plate for ELISA comprises $3 \cdot 10^7 \mu\text{m}^2$, i.e. 300 thousand times greater [36]. Currently immunochips are usually used for multiparametric tests, small areas of binding are incubated in their frameworks till achievement of equilibrium with the total sample volume. In this case the achieved immunochemical reaction remains to be diffusion-controlled, and performance of the test requires several hours [57]. Incubation of reagents directly in the areas of binding by the formation of thin layers of fluid allows a sufficient reduction of time for formation of detected complexes. As a result the duration of the assay can comprise 10-15 minutes, corresponding to modern demands to express analysis [58, 59].

A significant limitation for the introduction into practice of immunochip technology of 5-10 years has been the involvement of complicated and expensive optical equipment – confocal microscope, CCD-camera, etc – for highly sensitive detection of a tagged compound in the quantities, which can bind at a small area of a chip. At the moment relatively cheap portable devices have been invented to solve these tasks, which shall assist more rapid introduction of immunochips into clinical practice [58, 60].

Reduction of duration of heterogeneous immunoassay is also reached by its transfer into the flow mode with the use of cells of small diameter. Flow-injection analysis, suggested by Ruzicka and Hansen [61], is grounded on automatic injection of fixed volume of a sample into continuous flow of a buffer solution. Carriers (sorbents) with immobilized antibodies are used to separate the detected specific complexes in flow-injection immunoassay, and a detector registers a product of enzymatic reaction after binding

of enzyme-marker with the sorbent. The use of flow-injection systems for immunoassay incites the transfer of immunochemical and enzymatic reactions into kinetic mode, reducing the contact time to several minutes and, respectively, reducing the duration of the assay. The necessary conditions for obtaining reproducible data in kinetic mode is stability of such parameters as the contact time of reagents, temperature and volume of the analyzed sample. In this respect for flow-injection immunoassay principal significance has the availability of serially produced devices for automatic performance of all injection manipulations.

Membrane immunochromatographic assay, which brief specification was presented in the section 2, can also be qualified as a variant of flow heterogeneous immunoassay. In a classical variant the main limitation of immunochromatography is low sensitivity due to the use of colloidal dyed particles as directly detected markers. In recent years a number of developments have been suggested, which overcome this limitation and accomplish amplification of detected signal (see section 3), or transfer to alternative markers, revealed in lower concentrations [32, 62]. Thus the number of works depicts the option of more sensitive detection in the membrane assay of colloidal semiconducting fluorescent markers [63, 64]. Significant reduction of the detection limit can be achieved due to transfer from optical detection of coloured markers to the registration of their other physical properties, for example, electrical and magnetic. Thus, highly-sensitive

Priority labels for rapid immunoassays

Label	Example(s) of application
Spheric gold nanoparticles	[97, 98]
Other gold nanoparticles	[99, 100]
Liposomes	[101, 102]
Gold nanoparticles + magnetic particles	[103]
Different nanoparticles	[104–106]
Fluorescent dyes	[107, 108]
Magnetic particles	[109, 110]
Quantum dots	[64, 111, 112]
Lanthanides	[113, 114]
Latex particles	[115]
Upconverting phosphor	[116, 117]
Eu(III) chelate microparticles	[118, 119]

immunochemical determination of troponin with the use of magnetic nanoparticles is described in [65]. Several immunochemical systems with electrochemical registration of markers are suggested [66–68], confirming the potential of this approach. Table summarizes several examples of application of different labels in rapid tests.

5. Homo+heterogeneous immunoanalytical systems

Considering benefits and disadvantages of homogenous and heterogeneous immunoanalytical methods it is considered advisable to combine in one scheme the rapid formation of immune complexes in the solution and efficacy of their detection in heterogeneous systems. A promising approach, assuring achievement of this target is implementation of polyelectrolytes in immunoassay. Polyelectrolyte separation in immunoassay can be performed on the ground of:

- interaction of counterions (polycation-polyanion) pair [69, 70];
- interaction of polyelectrolyte-ion of metal pair [71];
- monomer polymerization [72–76].

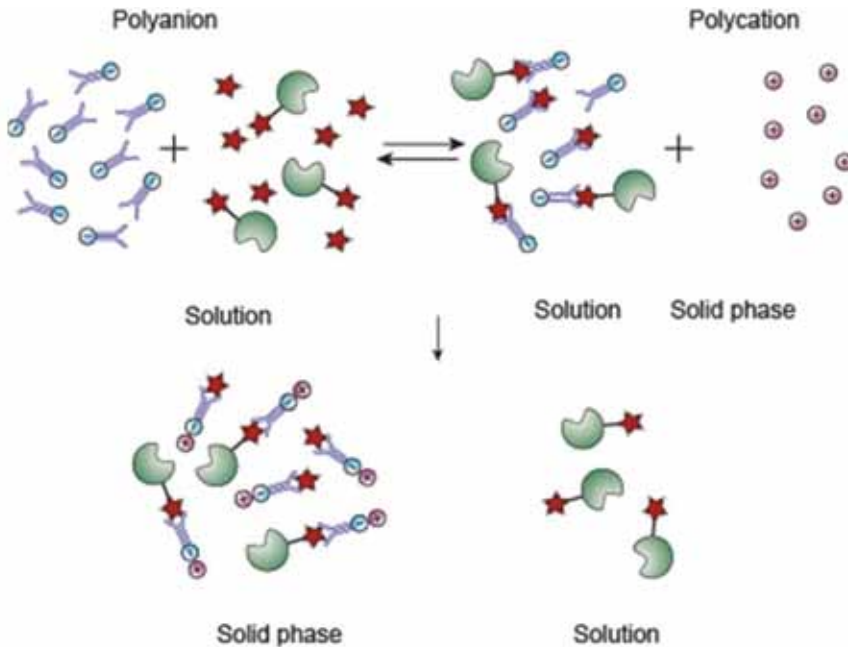


Fig. 3. Principle of polyelectrolyte separation in immunoassay

The first variant of separation was performed with the use as counterions of linear water soluble polyelectrolytes: polyanion - polymethacrylic acid, polycation - poly-N-ethyl-4-vinylpyridine or poly-N-N'-diethyl diallammonium. These polymers interact with each other in a wide range of conditions almost immediately forming an insoluble complex. Due to this, having obtained a conjugate of one of polyelectrolytes with an immunoreagent, we may perform the detection of analyzed antigen in solution as in case of usual rapid homogenous methods, as then, with the addition of counterion into the system, to separate rapidly formed immune complexes (Fig. 3).

A performed comparison of traditional solid-phase ELISA and ELISA on the basis of polyelectrolytes for detection of such compounds as insulin, testosterone, immunoglobulins, hepatitis B surface antigen demonstrated that the use of polymeric carriers allows reducing the time of analysis from 2-3 hours to 15-30 minutes without losses in sensitivity and specificity [77].

The second variant of separation implements the polyelectrolyte-ion of metal pair. The procedure, suggested by Auditore-Hargreaves K., is based on the use of polymeric carriers, which solubility depends on the presence of cations [72]. Water-soluble polymers can be precipitated, for example, with the reduction of pH or adding of such ions as Ca^{2+} , and repeatedly transferred into the solution - by the increase of pH and adding of chelating agents (ion-citrate, ethylenediaminetetraacetic acid, etc). Homogeneous immunoassay on the basis of algic acid is developed, which assures as 30-minute identification of antigens, their molecular weight being within the range from 100 to 50000 Da [72].

The third variant, suggested by Hoffman A.S. et al, is grounded on the generation of a solid polymeric phase from soluble monomer. The systems of immunoglobulins detection with free-radical and temperature initiation of polymerization are developed on the basis of this principle. The first system (polymerization *de novo*) is grounded on the use of two types of antibodies conjugates: antibodies(1)-fluorophor and antibodies(2)-organic monomer [73-75, 78]. Upon the completion of immunochemical reaction the polymerization reaction is initiated by free radicals. As a results of polymerization insoluble polymeric particles are formed; content of the marker in it is proportionate to the quantity of antigen in the sample. The second system is based on implementation of temperature-dependent polymers [73, 79]. Here, the same as by polymerization *de novo*, two types of conjugated antibodies are used. Formation of specific immune complexes happens at the temperature lower than the critical one for the given polymer, and an increase of temperature allows separating the complex from the solution, by this the number of marked antibodies, included into precipitate, is proportionate to the content of antigen in the sample. Poly-

mers and co-polymers of acrylamide with N-alkyl acrylamide are the most promising for this immunoassay.

Poly-N-isopropyl acrylamide and its co-polymers, except for thermal precipitation, can be precipitated by 14-20% ammonium sulfate. Free IgG does not precipitate such concentrations of salt. So this method allows separating free immunoglobulins from conjugated with polymer ones.

Based on this principle immunoanalytical methods with the use of enzymatic and fluorescent markers were developed there. They demonstrated efficiency for the detection of immunoglobulin G, hepatitis B surface antigen, *Chlamidia trachomatis* etc. [73, 80].

Together with interpolyelectrolyte interaction, an efficient solution, combining all benefits of homogeneous and heterogeneous immunoassays, is the implementation of magnetic immune sorbents [81–83]. The use of these particles as a solid phase in immunoassay gives the possibility to increase significantly the area of surface to immobilize reagents, distribute them equally along the total volume of the reaction medium, hence accelerating heterogeneous interactions. By this after completion of the first stage of the assay implementation of the outside magnetic field assures simple and rapid separation of reagents. The use of magnetic colloidal particles (MNP) as a solid phase in ELISA allows improving its analytical characteristics. There is a number of works on MNP implementation in ELISA for the detection of compounds of various nature – pesticides, hormones, mycotoxins, allergens, proteins, viruses, bacteria [84–87]. In this case the duration of specific interactions can be reduced to 5-10 minutes, and the analysis in general up to 20-30 minutes. It is important also that magnetic separation allows performing pre-concentration of target compound from a big sample volume. This concentration allows additional reduction of the detection limit of the target compound by 1-2 orders [87].

Ordinary centrifuging can be also used to separate immunosorbent from the reaction medium. This approach is accomplished in a number of test-systems with the use of antibodies, immobilized at the particles of high-disperse latex, usually – polystyrene (which allows using standard protocols of absorption immobilization being developed for ELISA) [88].

6. Homogeneous immunoanalytical systems

Implementation of homogeneous methods of immunoassays is significantly limited with the influence of sample components on registered signal, due to which it is complicated to distinguish this influence from specific complex formation. Pretty solution of this problem is the use of differential measurements in the assay, when results of measuring with specific immune reagents, with antibodies and with the compound, which are not knowingly present in the test sample, are compared [89].

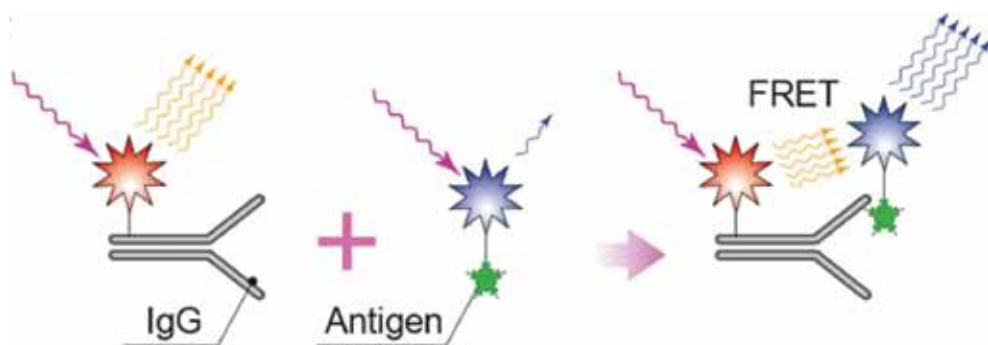


Fig. 4. Principle of FRET-based immunoassay

Nevertheless, solutions with minimal influence of matrix on the result of the assay are preferable, despite the absence of the separation of reaction mixture components before measurements at homogeneous assay. In this respect significant interest is drawn by new markers and new ways of immune complexes registration. Thus, the application of lanthanides complexes as markers allows reducing the impact of background signal due to possibility of prolonged registration and integration of fluorescence [90, 91]. An alternative approach is the use of long wavelength (600–1000 nm) fluorescence that also reduces the background impact from sample constituents [92–94].

One more promising approach is the use of the signal, generated by close spatial approach of interacting immune reagents. For example, a number of immunoassay systems was described, grounded on the effect of fluorescence resonance energy transfer (FRET) [95, 96], occurring by the approach of two markers, conjugated with antibody and antigen (Fig. 4).

7. Conclusion and Prospects

As the presented brief analysis shows, the developments, targeted at the increase of analytical characteristics of immunochemical test-systems are extremely diverse. The efforts of the researchers are not concentrated on acceleration of sensitivity or increase of sensitivity of rapid tests, but suggest various solutions within the field of options, depicted on the Fig. 1. In this respect it is complicated to make exact forecast regarding more promising directions of immunoassay. However, it should be expected that the principle of multi-level diagnostics, including preliminary screening and further confirming test shall preserve in the near future. One can also expect the preservation of two clusters – more rapid and more sensitive analytical methods. However, the introduction into practice of develop-

ments, related with analytical markers, new methods of assay performance and registration of immune complexes shall lead to substitution of conventional methods with new ones. Modern means of registration of ultra-small signals and data processing allows the effective control over the content of compounds in samples in extreme low concentrations. In this, case the diagnostic decisions shall be made considering information about the content of a big number of diagnostically significant compounds, which shall result in the development of multiparametric analytical systems, as well as information about peculiarities of patient's metabolism, considered in diagnostic data bases within the frameworks of the shift to personified medicine. Simplification and increase of sensitivity of test-systems for field assay will result in their active implementation in non-medical spheres.

References

1. *Panchenko L. F. et al.* // *Narcology*. – 2011. **10**(12). – P. 64–68.
2. *Yalow R. S., Berson S. A.* // *J. Clin. Invest.* – 1960. – **39**. – P. 1157–1175.
3. *Arevalo F. J. et al.* // *Biosens. Bioelectron.* – 2012. – **32**(1). – P. 231–237.
4. *Pande J., Szewczyk M. M., Grover A. K.* // *Biotechnol. Adv.* – 2010. – **28**(6). – P. 849–858.
5. *de Wildt R. M. T. et al.* // *Nat. Biotechnol.* – 2000. – **18**(9). – P. 989–994.
6. *Andersson L. I.* // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* – 2000. – **739**(1). – P. 163–173.
7. *Sergeyeva T. A. et al.* // *Analyt. Chim. Acta.* – 2007. – **582**(2). – P. 311–319.
8. *Sergeyeva T. A. et al.* // *Macromolecules.* – 2003. – **36**(19). – P. 7352–7357.
9. *Bullin N. G., Meares C. F.* // *Acc. Chem. Res.* – 2006. – **39**(10). – P. 780–787.
10. *Chmura A. J., Orton M. S., Meares C. F.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – **98**(15). – P. 8480–8484.
11. *Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М.* Теория и практика иммуноферментного анализа. – Высш. шк., 1991. – 287 с.
12. *Blake R. C. et al.* // *Bioconjug. Chem.* – 2004. – **15**(5). – P. 1125–1136.
13. *Blake D. A. et al.* // *Biosens. Bioelectron.* – 2001. – **16**(9–12). – P. 799–809.
14. *Johnson D. K.* // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* – 2003. – **6**(3). – P. 245–255.
15. *Erlanger B. F. et al.* // *Nano Lett.* – 2001. – **1**(9). – P. 465–467.
16. *Hendrickson O. et al.* // *Analyst.* – 2012. – **137**(1). – P. 98–105.
17. *Turpeinen U., Hohenthal U., Stenman U.-H.* // *Clin. Chem.* – 2003. – **49**(9). – P. 1521–1524.
18. *Byzova N. A. et al.* // *Russian J. Bioorg. Chem.* – 2009. – **35**(4). – P. 482–489.
19. *Kohler G., Milstein C.* // *Nature.* – 1975. **256**(5517). – P. 495–497.
20. *Yagami H. et al.* // *Pharm. Patent Analyst.* – 2013. – **2**(2). – P. 249–263.
21. *Hoogenboom H. R.* // *Nat. Biotechnol.* – 2005. **23**(9). – P. 1105–1116.
22. *Altshuler E. P., Serebryanaya D. V., Katrukha A. G.* // *Biochemistry (Mosc).* – 2010. – **75**(13). – P. 1584–1605.
23. *Hermanson G. T.* / *Bioconjug. Tech.* – Academic Press, 2008.

24. Wang G. et al. // *Forensic Sci. Int.* – 2011. – **206**(1–3). – P. 127–131.
25. Smith D., Eremin S. // *Analyt. Bioanalyt. Chem.* – 2008. – **391**(5). – P. 1499–1507.
26. Booth C. K. et al. // *Ann. Clin. Biochem.* – 2009. – **46**(5). – P. 401–406.
27. Zezza F. et al. // *Analyt. Bioanalyt. Chem.* – 2009. – **395**(5). – P. 1317–1323.
28. Urusov A. E., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. // *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologija.* – 2010. – **46**(3). – P. 276–290.
29. Raphael Wong, Tse H. *Lateral Flow Immunoassay* / Ed. Raphael Wong and H. Tse. – Humana Press, 2009.
30. Posthuma-Trumpie, G., Korf J., van Amerongen A. // *Analyt. Bioanalyt. Chem.* – 2009. – **393**(2). – P. 569–582.
31. Chun P. *Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays*, in *Lateral Flow Immunoassay*, R. Wong and H. Tse, Editors. – Humana Press, 2009. – P. 1–19.
32. Goryacheva I. Y., Lenain P., De Saeger S. // *TrAC Trends Analyt. Chem.* – 2013. – **46**(0). – P. 30–43.
33. Jackson T. M., Ekins R. P. // *J. Immunol. Methods.* – 1986. – **87**(1). – P. 13–20.
34. Lee S., Kang S. H. // *J. Nanomater.* – 2012. – **2012**. – P. 7.
35. Kathryn M. M. et al. // *Nanotechnology.* – 2010. – **21**(25). – P. 255503.
36. Wild D. // *The immunoassay handbook.* – Elsevier Science Limited. – 2005. – 930 p.
37. Urusov A. E. et al. // *Sens. Actuators B Chem.* – 2011. – **156**(1). – P. 343–349.
38. van der Putten R. F. et al. // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2005. – **43**(12). – P. 1386–1391.
39. Kumagai I., Tsumoto K. / *Antigen–Antibody Binding*, in *eLS.* – John Wiley & Sons, Ltd., 2001.
40. Webster D. M., Henry A. H., Rees A. R. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1994. – **4**(1). – P. 123–129.
41. Razai A. et al. // *J. Mol. Biol.* – 2005. – **351**(1). – P. 158–169.
42. Koliassnikov O. V. et al. // *Acta Naturae.* – 2011. – **3**(3). – P. 85–92.
43. Lippow S. M., Wittrup K. D., Tidor B. // *Nat. Biotechnol.* – 2007. – **25**(10). – P. 1171–1176.
44. Hill H. D., Mirkin C. A. // *Nat. Protocols.* – 2006. – **1**(1). – P. 324–336.
45. Blazková M. et al. // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – **26**(6). – P. 2828–2834.
46. Blazková M. et al. // *Europ. Food Res. Technol.* – 2009. – **229**(6). – P. 867–874.
47. Blazkova M. et al. // *Czech. J. Food Sci.* – 2009. – **27**. – P. S350–S353.
48. Rokni M. B. et al. // *Iran. J. Public Health.* – 2006. – **35**(2). – P. 29–32.
49. Zhou Y. et al. // *J. Med. Coll. PLA.* – 2007. – **22**(6). – P. 347–351.
50. ten Have R. et al. // *Biologicals.* – 2012. – **40**(1). – P. 84–87.
51. Ford A. // *CAP Today.* – 2004. – **18**(6). – P. 18–20, 22–4, 26 passim.
52. Chen R. et al. // *Clin. Chem.* – 1984. – **30**(9). – P. 1446–1451.
53. Arefyev A. A. et al. // *Analyt. Chim. Acta.* – 1990. – **237**(0). – P. 285–289.
54. Mattiasson B. et al. // *TrAC. Trends Analyt. Chem.* – 1990. – **9**(10). – P. 317–321.
55. Kumar M. A. et al. // *Analyt. Chim. Acta.* – 2006. – **560**(1–2). – P. 30–34.

56. Ng A. C., Uddayasankar U., Wheeler A. // *Analyt. Bioanalyt. Chem.* – 2010. – **397**(3). – P. 991–1007.
57. Price C. P., Newman D. J. / *Principles and practice of immunoassay.* – Macmillan Reference Ltd., 1997.
58. Han K. N., Li C. A., Seong G. H. // *Ann. Rev. Analyt. Chem.* – 2013. – **6**(1). – P. null.
59. Wang S. *et al.* // *Biosens. Bioelectron.* – 2012. **31**(1). – P. 212–218.
60. Gervais L., de Rooij N., Delamarche E. // *Adv. Mater.* – 2011. – **23**(24). – P. H151–76.
61. Ružička J., Hansen E. H. // *Analyt. Chim. Acta.* – 1975. – **78**(1). – P. 145–157.
62. Blazkova M., Rauch P., Fukal L. // *Biosens. Bioelectron.* – 2010. – **25**(9). – P. 2122–2128.
63. Zhu X. *t al.* // *J. Agric. Food Chem.* – 2011. – **59**(6). – P. 2184–2189.
64. Zou Z. *et al.* // *Analyt. Chem.* – 2010. – **82**(12). – P. 5125–5133.
65. Xu Q. *et al.* // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2009. – **29**(3). – P. 702–707.
66. Lin Y.-Y. *et al.* // *Biosens. Bioelectron.* – 2008. – **23**(11). – P. 1659–1665.
67. Liu G. *et al.* // *Anal. Chem.* – 2007. – **79**(20). – P. 7644–7653.
68. Zou Z. *et al.* // *Anal. Chem.* – 2010. – **82**(12). – P. 5125–5133.
69. Yazynina E. V. *et al.* // *Analyt. Chem.* – 1999. – **71**(16). – P. 3538–3543.
70. Neustroeva N. P. *et al.* // *Vopr. Virusol.* – 1989. **34**(3). – P. 351–354.
71. Marshall D. L. Soluble insoluble polymers in enzymeimmunoassay, S.D. Inc., I. Seragen Diagnostic, 1200 South Madison Avenue, Indianapolis, Indiana 46206, A Corp. Of New York, and C. First National Bank Of Chicago The, Illinois, A National Banking Association, Editors. 1985: USA.
72. Auditore-Hargreaves K. *et al.* // *Clin. Chem.* – 1987. – **33**(9). – P. 1509–1516.
73. Nowinski R. C., Hoffman A. S. Polymerization-induced separation immunoassays, 1987, Google Patents.
74. Nowinski R. C., Hoffman A. S. Polymerization-induced separation immunoassays, 1989, Google Patents.
75. Thomas E. K. *et al.* Polymerization-induced separation assay using recognition pairs, 1988, Google Patents.
76. Hoffman A. S. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. – **65**(1). – P. 10–16.
77. Dzantiev B. B. *et al.* // *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* – 1990. – **311**(6). – P. 1482–1486.
78. Izumrudov V., Zezin A. B., Kabanov V. A. // *Russian Chem. Rev.* – 1991. – **60**(7). – P. 792–806.
79. Monji N. *et al.* Thermally induced phase separation immunoassay, 1988, Google Patents.
80. Monji N., Hoffman A. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1987. – **14**(2). – P. 107–120.
81. Colombo M. *et al.* // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. – **41**(11). – P. 4306–4334.
82. Zhang Y., Zhou D. // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* – 2012. – **12**(6). – P. 565–571.
83. Giaever I. S., (NY), Diagnostic method and device employing protein-coated magnetic particles, 1977, General Electric Company (Schenectady, NY): United States.
84. Speroni F. *et al.* // *Analyt. Bioanalyt. Chem.* – 2010. – **397**(7). – P. 3035–3042.

85. Xie L. et al. // Afr. J. Microbiol. Res. – 2011. – 5(1). – P. 28–33.
86. Xiao Q. et al. // Clin. Biochem. – 2009. – 42(13–14). – P. 1461–1467.
87. Pappert G. et al. // Microchim. Acta. – 2010. – 168(1–2). – P. 1–8.
88. Kim S. et al. // Polymer Bulletin. – 2009. 62(1). – P. 23–32.
89. Nabok A. V. et al. / Registration of low molecular weight environmental toxins with total internal reflection ellipsometry. in Sensors, 2004. Proceedings of IEEE. 2004.
90. Hagan A. K., Zuchner T. // Analyt. Bioanalyt. Chem. – 2011. – 400(9). – P. 2847–2864.
91. Mikola H., Takalo H., Hemmila I. // Bioconjug. Chem. – 1995. – 6(3). – P. 235–241.
92. Luchowski R. et al. // Curr. Pharm. Biotechnol. – 2010. – 11(1). – P. 96–102.
93. Sánchez-Martínez M. L., Aguilar-Caballos M. P., Gymez-Hens A. // Talanta. – 2009. – 78(1). – P. 305–309.
94. Sánchez-Martínez M. L. et al. // Talanta. – 2007. – 72(1). – P. 243–248.
95. Varghese S. S. et al. // Lab. Chip. – 2010. – 10(11). – P. 1355–1364.
96. Clegg R. M. // Curr. Opin. Biotechnol. – 1995. 6(1). – P. 103–110.
97. Byzova N. A. et al. // J. AOAC Int. – 2010. 93(1). – P. 36–43.
98. Molinelli A. et al. // J. Agric. Food Chem. – 2008. – 56(8). – P. 2589–2594.
99. Venkataramasubramani M., Tang L. Development of Gold Nanorod Lateral Flow Test for Quantitative Multi-analyte Detection, in 25th Southern Biomedical Engineering Conference 2009, 15 – 17 May 2009, Miami, Florida, USA, A.J. McGoron, C.-Z. Li, and W.-C. Lin, Editors. 2009, Springer Berlin Heidelberg. – P. 199–202.
100. Alekseeva A. V. et al. // Appl. Opt. – 2005. – 44(29). – P. 6285–6295.
101. Chu P.-T. et al. // Europ. Food Res. Technol. – 2009. – 229(1). – P. 73–81.
102. Khreich N. et al. // Anal. Biochem. – 2008. – 377(2). – P. 182–188.
103. Tang D. et al. // Biosens. Bioelectron. – 2009. – 25(2). – P. 514–518.
104. Noguera P. et al. // Analyt. Bioanalyt. Chem. – 2010. – 399(2). – P. 1–8.
105. Holubová-Mičková B. et al. // Europ. Food Res. Technol. – 2010. – 231(3). – P. 467–473.
106. van Amerongen A. et al. // J. Biotechnol. – 1993. – 30(2). – P. 185–195.
107. Oh S. W. et al. // Clin. Chim. Acta. – 2009. – 406(1–2). – P. 18–22.
108. Ahn J. S. et al. // Clin. Chim. Acta. – 2003. – 332(1–2). – P. 51–59.
109. Zheng C. et al. // Food Control. – 2012. – 26(2). – P. 446–452.
110. Wang Y. et al. // Mater. Sci. Eng. C. – 2009. – 29(3). – P. 714–718.
111. Kerman K. et al. // Talanta. – 2007. – 71(4). – P. 1494–1499.
112. Berlina A. et al. // Analyt. Bioanalyt. Chem. – 2013. – 405(14). – P. 4997–5000.
113. Xia X. et al. // Clin. Chem. – 2009. – 55(1). – P. 179–182.
114. Rundstrom G. et al. // Clin. Chem. – 2007. – 53(2). – P. 342–348.
115. Greenwald R. et al. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2003. – 46(3). – P. 197–203.
116. Song X., Knotts M. // Anal. Chim. Acta. – 2008. – 626(2). – P. 186–192.
117. Qu Q. et al. // J. Microbiol. Methods. – 2009. – 79(1). – P. 121–123.
118. Xia X. et al. // Clin. Chem. – 2009. – 55(1). – P. 179–182.
119. Rundström G. et al. // Clin. Chem. – 2007. – 53(2). – P. 342–348.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ХОЛЕРНОМУ ТОКСИНУ И ТЕРМОЛАБИЛЬНОМУ ЭНТЕРОТОКСИНУ *E. coli* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА ТОКСИНОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Е. В. ГРИШИН, Т. И. ВАЛЯКИНА

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт биоорганической химии им. академиков
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

*Получены моноклональные антитела к холерному токсину (СТ) и термолабильному энтеротоксину *E. coli* (LT), перекрестно не взаимодействующие с родственным токсином. Подобраны пары антител для количественного определения СТ и LT в «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа (ИФА) и биплексном иммунофлуоресцентном анализе с применением технологии xMAP (Luminex). Минимальные детектируемые концентрации (МДК) СТ и LT, определенных в формате «сэндвич»-ИФА – 0,2 и 0,4 нг/мл, значительно выше соответствующих величин, определенных в формате биплексного анализа – 0,01 и 0,08 нг/мл. Присутствие в пробах молока, бульона, воды из открытого водоема и носоглоточных смывов не оказывает влияния на величины МДК СТ, определенных обоими методами. В аналогичных пробах, содержащих LT, величины МДК возрастают по сравнению с соответствующей величиной для контрольного буфера.*

Интенсивное развитие международной экономической деятельности, открытие границ, усиливающаяся миграция населения, рост торговли и расширение сообщения привели к быстрому распространению инфекционных болезней. В современных условиях в любое время, может начаться эпидемия, возбудителями которой, оказываются новые или уже хорошо известные, занесенные из эндемических очагов, микроорганизмы. К основным современным источникам биологической опасности, представляющим наибольшую угрозу для населения, относят патогенные микроорганизмы, микроскопические грибы, и продукты их жизнедеятельности. Токсические продукты микроорганизмов обладают высокой активностью и чрезвычайно токсичны для человека. В России имеется большой организационный опыт в области противодействия инфекционным заболеваниям, однако дальнейшее совершенствование методов диагностики и профилактики опасных инфекций на сегодняшний день остается важнейшей проблемой.

Бактериальные токсины – это секретируемые микробные белки, обычно ферменты, которые повреждают и убивают клетки хозяина в исключительно низких концентрациях. Исходя из механизма действия, токсины группируют следующим образом: порообразующие токсины (альфа-токсин *Staphylococcus aureus*, гемолизин *Escherichia coli*), ингибиторы синтеза белка (дифтерийный токсин, шига-токсин), генераторы образования вторичных мессенджеров (холерный токсин и термолабильный энтеротоксин *E. coli*), протеолитические токсины (ботулинические, столбнячный), активаторы иммунного ответа (стафилококковые энтеротоксины), трехсоставные токсины (сибиреязвенный токсин) [1].

Холерный токсин (СТ), продуцируемый *Vibrio cholerae* и отвечающий за развитие симптомов такого смертельно опасного заболевания как холера, и термолабильный энтеротоксин продуцируемый энтеротоксигенными штаммами *E. coli*, сокращенно LT, отвечающий за развитие симптомов менее опасного, чем холера, но более распространенного заболевания, называемого «диарея путешественников», являются родственными токсинами. Они имеют большое сходство по структуре, функциональному действию, иммунохимическим характеристикам. Сходство аминокислотной последовательности молекул токсинов составляет более 80% [2]. Поэтому большинство методов детекции не позволяет дифференцированно определять СТ и LT в исследуемых образцах. Так как холера по сравнению с диареей пу-

Сокращения: АДФ – аденозиндифосфат; ГТФ-аза – гуанозинтрифосфатаза; ИФА – иммуноферментный анализ; ИХА – иммунохимический анализ; МА – моноклональное антитело; МДК – минимальная детектируемая концентрация; МИА – мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ; НАФ – неполный адьювант Фрейнда; ОРД – ортофенилендиамин; ПААГ – полиакриламидный гель; ПЭГ – полиэтиленгликоль; цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; biot – биотин; BSA – бычий сывороточный альбумин; СТ – холерный токсин; DMEM – ростовая среда Игла в модификации Дульбекко; DMSO – диметилсульфоксид; EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид; FCS – эмбриональная телячья сыворотка; НАТ – раствор гипоксантина, аминоптерина и тимидина или ростовая среда, содержащая эти компоненты; НТ – раствор гипоксантина и тимидина или ростовая среда, содержащая эти компоненты; ID – идентификационный номер пула микросфер; IgA – иммуноглобулин класса А; IgG – иммуноглобулин класса G; LT – термолабильный энтеротоксин *E. coli*; MFI – интенсивность медианного флуоресцентного сигнала; PBS – фосфатно-солевой буфер; PBST – фосфатно-солевой буфер с 0,05% Tween 20; SDS – додецилсульфат натрия; SPF – категория мышей, свободных от патогенной микрофлоры; sulfo-NHS – N-гидроксисульфосукцинимид; xMAP – мультиплексный анализ с применением микросфер, различающихся по спектральным характеристикам, и проточного анализатора.

тешественников, заболевание, которое в отсутствие лечения в 50% случаев заканчивается летальным исходом, большое значение в диагностике этих заболеваний является дифференцированное определение токсинов.

Холерный токсин, продуцируемый *Vibrio cholerae*, относится к группе токсинов, генерирующих образование вторичных мессенджеров, способных в большой степени усиливать и искажать клеточную реакцию на различные сигналы. Холерный токсин обладает АДФ-рибозилтрансферазной активностью по отношению к ГТФ-азе клеток млекопитающих. После АДФ-рибозилирования ГТФ-аза вызывает пролонгированную активацию аденилатциклазы и резкое увеличение цАМФ в энтероцитах. Увеличение концентрации цАМФ приводит к выведению ионов хлора, бикарбоната и воды из клеток, вызывая, тем самым, потерю электролитов и сильное обезвоживание [3].

Данные токсины традиционно детектируют биологическим методом, наблюдая их патогенное действие на одноклеточных организмах, культурах клеток, куриных эмбрионах, а также на лабораторных животных. Эти методы трудоемки, длительны (занимают около 2–6 суток) и характеризуются высокой себестоимостью. Для тестирования одной пробы используют несколько животных, тесты проводят только в лабораториях, имеющих специальный сертификат [4, 5]. Для детекции и количественного определения токсинов используют также инструментальные методы, основанные на применении оборудования с высокой чувствительностью детекции: масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез и т.д. По чувствительности методы сравнимы с биологическими методами, но их использование ограничено кругом специально оборудованных лабораторий, имеющих в своем распоряжении дорогостоящую аппаратуру и высококвалифицированные кадры, что ограничивает использование этих методов, делая их недоступными широкому кругу специалистов [6].

В настоящее время наиболее широкое распространение в практике диагностирования бактериальных токсинов получили методы иммуноанализа. Ключевым компонентом в иммуноаналитических системах являются антитела. Для иммунохимического анализа токсинов используются три основных типа антител: моноспецифические поликлональные антитела, моноклональные антитела и рекомбинантные антитела или фрагменты антител [7].

Целью настоящего исследования явилось получение методом гибридной техники моноклональных антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*; не обладающих перекрестной активностью; определение их иммунохимических характеристик

и создания биплексной тест-системы на основе мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа с применением микросфер (МИА) для одновременной количественной детекции холерного токсина и термолabileного энтеротоксина *E. coli* в одной анализируемой пробе.

Экспериментальная часть

В работе были использовали реактивы: среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM), фетальная телячья сыворотка (FCS), глутамин, раствор гипоксантин-аминоптерин-тимидин (HAT) – GIBCO-Invitrogen (США); неполный адьювант Фрейнда, пристан, BSA, DMSO, 4-хлор-1-нафтол, 3,3-диаминобензидин, OPD (ортофенилендиамин), N-оксисукцинимидный эфир биотина, Твин-20, метилизотиазолон гидрохлорид (MIT) и холерный токсин (*Vibrio cholerae*) – Sigma (США), SDS – Serva (Германия), полиакриламид – Amresco (США); нитроцеллюлозная мембрана BA 85 – Schleicher & Schuell (Германия); протеин-A-сефароза – GE-Healthcare (США), поликлональные козьи антитела, меченные пероксидазой хрена, к мышинным иммуноглобулинам, меченный пероксидазой хрена стрептавидин и набор для изотипирования иммуноглобулинов (mouse immunoglobulin isotyping ELISA kit) – BD Biosciences Pharmingen (США); культуральный пластик и планшеты для ИФА – Costar (США); карбоксилированные xMAP микросферы – Luminex Corporation (США), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодииимид гидрохлорид (EDC), N-гидроксисульфосульфосукцинимид (*sulfo*-NHS) – Pierce (США); стрептавидин, меченный фикоэритрином (SA-PE) – One Lambda (США), поликлональные антитела, меченные фикоэритрином, к мышинным иммуноглобулинам – Dako (Швеция), снятое сухое молоко – Fluka (Германия). Стафилококковый энтеротоксин А (SEA), стафилококковый энтеротоксин В (SEB), термолabileный энтеротоксин *E. coli* (LT) были любезно предоставлены д.б.н. Ю. В. Вертиевым (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи РАМН, Москва).

Получение гибридом

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к холерному токсину и термолabileному энтеротоксину *E. coli*, проводили общепринятым методом гибридомной технологии, предложенным Келлером и Мильштейном [8]. Для иммунизации использовали мышей (самок массой 18 г) линии BALB/c конвенциональной категории SPF. Животных иммунизировали в подушечки задних лапок препаратом токсина в присутствии неполного адьюванта Фрейнда.

Мышей категории SPF иммунизировали СТ или LT в дозе 10 мкг/мышь дважды с интервалом 2 недели. Мышей конвенцио-

нальной категории иммунизировали СТ или ЛТ трижды с интервалом 2 недели дозами токсина 2,5; 5 и 20 мкг/мышь. На четвертый день после второй иммунизации в сыворотке крови мышей обеих категорий определяли титр специфических антител к СТ и ЛТ методом непрямого твердофазного ИФА.

Через 6 суток после последней иммунизации у мышей забирали подколенные лимфоузлы, из которых выделяли лимфоциты для гибридизации с клетками миеломы SP2/0. Гибридизацию проводили при соотношении клеток 5 : 1 в 45%-ом растворе ПЭГ-4000 с 10% DMSO в среде DMEM в течение 1 мин при совместной инкубации. После гибридизации клетки разносили по 96-луночным планшетам, в которые за 24 ч до этого помещали мышинные макрофаги. Клетки культивировали в селективной среде: DMEM с 20%-ым FCS, 4 мМ L-глутамином, 5 мМ меркаптоэтанолом, 0,1 мМ гипоксантином, $1,6 \times 10^{-5}$ М тимидином, 4×10^{-7} М аминоптерином.

После завершения этапа селекции гибридных клеток от родительской миеломы их культивировали в среде, не содержащей аминоптерин. Через 7–10 суток после гибридизации из лунок с активно растущими клетками отбирали культуральную среду и тестировали ее непрямым твердофазным ИФА на наличие антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*. Из лунок, в культуральной среде которых регистрировали достоверно положительную реакцию с токсинами, отбирали клетки и клонировали их трижды методом предельных разведений в НТ-среде роста. После двух последних клонирований число положительных клонов обычно составляло 100%.

Продукция антител в асцитной жидкости мышей

Мышам линии Balb/C (самки) вводили внутрибрюшинно 0,5 мл пристана. Через 10 дней после введения препарата животным вводили суспензию клеток гибридом в количестве $(0,5-1) \times 10^7$ клеток. После формирования асцита мышей декапитировали и забирали асцитную жидкость, содержащую моноклональные антитела. Жидкость центрифугировали при 300 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Клеточный осадок подвергали процедуре замораживания при -70 °С, а из супернатанта выделяли моноклональные антитела.

Очистка моноклональных антител из асцитной жидкости аффинной хроматографией на протеин-А-сефарозе

На колонку, содержащую протеин-А-сефарозу, объемом 3 мл, уравновешенную 5 объемами стартового буфера (1,5 М глицин, 0,15 мМ NaCl, pH 8,9), наносили образец – асцитную жидкость

(3 мл), разведенную тремя объемами стартового буфера. Колонку промывали стартовым буфером, собирая в отдельную пробирку несвязавшиеся с сорбентом белки. Затем их элюировали буфером для элюции (0,1 М цитрат Na) с уменьшением градиента рН от 6,0 до 4,0. Наличие белков в элюатах регистрировали на проточном спектрофотометре при длине волны 280 нм. Регенерацию колонки проводили 0,1 М цитратным буфером, рН 3,0.

Все образцы, элюированные с колонки отдельными фракциями, диализовали против PBS с добавлением 0,02%-го азиды натрия при 4 °С в течение ночи. Препарат антител, полученных после хроматографии на протеин-А-сефарозе, концентрировали методом ультрафильтрации с использованием ячеек для ультрафильтрации (Amicon, США) и мембран, отсекающих белки с молекулярной массой более 10 кДа, до достижения концентрации антител в растворе 1–1,5 мг/мл. Концентрацию выделенного белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Электрофорез в полиакриламидном геле

Чистоту полученных препаратов антител оценивали электрофоретически. Электрофорез проводили в восстанавливающих условиях в 12,5%-ом ПААГ по методу Лэммли [9]. К анализируемому препарату антител добавляли равный объем 2-кратного разделяющего буфера, рН 6,8, содержащего 0,125 М Tris-HCl, 4%-й SDS и 20%-й глицирин, 10%-й 2-меркаптоэтанол. Образцы нагревали на водяной бане в течение 3 мин. В каждый образец добавляли по 1 мкл 0,2%-го раствора бромфенолового синего и вносили в лунки полиакриламидной пластинки, состоящей из концентрирующего 4%-го геля и разделяющего 12,5%-го геля. В качестве маркеров использовали смесь очищенных стандартных белков: фосфорилаза В (97 кДа), альбумин (66 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоангидраза (30 кДа), ингибитор трипсина (20,1 кДа) и α -лактальбумин (14,4 кДа). Электрофорез проводили при силе тока 10 мА до полного введения бромфенолового синего в гель, а затем при 20 мА. После окончания процесса (1,5–2 часа) гель окрашивали в течение 30 мин в 0,125%-ом растворе кумасси R-250 с последующим отмыванием геля в обесцвечивающем растворе до полного исчезновения фоновой окраски.

Тестирование специфической активности антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli* методом непрямого твердофазного ИФА

Для тестирования использовали коммерческий препарат СТ с исходной концентрацией 2 мг/мл, препарат LT с исходной кон-

центрацией 0,32 мг/мл. Аликвоту исходных препаратов разводили в 0,1 М бикарбонатном буфере рН 9,0 до концентрации 1 мкг/мл. Приготовленные растворы по 100 мкл вносили в лунки ИФА-планшетов с высокой степенью связывания. Планшеты инкубировали в течение ночи при 4 °С. После инкубации свободные центры связывания на пластике планшетов блокировали 1%-ым раствором BSA при 37 °С в течение 1 ч. Лунки планшетов промывали 3 раза PBS с 0,05%-ым Твином 20 (PBST) и 3 раза PBS. После промывок вносили 100 мкл культуральной среды или препаратов очищенных антител и планшеты инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. По окончании времени инкубации поверхность лунок планшета отмывали (как описано выше), вносили пероксидазный конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши, инкубировали 40 минут при комнатной температуре, отмывали и вносили субстрат пероксидазы – OPD в концентрации 1 мг/мл в 50 мМ цитратном буфере рН 4,5, содержащем 0,015% перекиси водорода. После развития окраски реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10%-й серной кислоты. Интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически, определяя оптическое поглощение при длине волны 492 нм.

Определение константы аффинности антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*

Константу аффинности моноклональных антител при связывании с холерным токсином или с термолабильным энтеротоксином *E. coli* определяли по методу Битти непрямым твердофазным ИФА [10].

Токсины сорбировали на поверхности лунок ИФА-планшета с высокой степенью связывания из растворов, взятых в двух концентрациях 0,5 мкг/мл и 1 мкг/мл, в объеме 100 мкл на лунку. Далее проводили не прямой твердофазный ИФА как описано выше. Препараты анализируемых антител титровали от 40 мкг/мл до 40 пг/мл с шагом 2. Строили графики зависимости оптического поглощения при длине волны 492 нм от концентрации МА. Константу аффинности определяли по формуле:

$$K_{\text{афф}} = 1/(4[AT'] - 2[AT]) \pm 3 \cdot SD,$$

где [AT'] – концентрация антител, соответствующая 50%-му связыванию при внесении в лунку планшета токсина в концентрации 0,5 мкг/мл, а [AT] – концентрация антител, соответствующая их 50%-у связыванию при внесении в лунку токсина в концентрации 1 мкг/мл. SD – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения A_n , $n = 3$.

Получение конъюгатов биотина с моноклональными антителами к холерному токсину и термолabileльному энтеротоксину *E. coli*

К препарату очищенных антител (1 мг/мл) в 0,1 М бикарбонатном буфере (рН 9,0) добавляли раствор оксисукцинимидного эфира биотина в ДМСО (1 мг/мл) из расчета 120 мкл реагента на 1 мг белка. Смесь инкубировали в темноте 3 ч при комнатной температуре, добавляли 1 М раствор Трис-глицинового буфера (рН 8,2) в объеме 50 мкл на 1 мл антител и диализовали против PBS. Полученный препарат биотинилированных антител хранили при 4 °С в PBS с 0,02% азида Na.

«Сэндвич»-вариант ИФА в формате планшета

В лунки ИФА-планшета с высокой степенью связывания вносили 100 мкл раствора связывающих антител к СТ или ЛТ в PBS с концентрацией 10 мкг/мл и инкубировали планшет в течение ночи при 4 °С. Свободные центры связывания на поверхности лунок планшета блокировали 1%-ым раствором сухого молока при инкубации в течение 1 ч при 37 °С. Далее в лунки планшета вносили токсин (СТ или ЛТ) в концентрации 1 мкг/мл и делали двоичные и троичные разведения токсина в PBST (от 1 мкг до 0,1 нг/мл), инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, затем планшет отмывали 3 раза раствором PBST и 3 раза раствором PBS. В пробу добавляли по 100 мкл проявляющих меченных биотином МА к соответствующему токсину (10 мкг/мл) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После отмывки добавляли раствор стрептавидина, меченого пероксидазой хрена, разведенного 1 : 1000 в PBST, и инкубировали 40 мин при 37 °С. В качестве субстрата пероксидазы использовали раствор OPD (1 мг/мл) (см. выше). После развития окраски реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10%-й серной кислоты. Интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически, определяя оптическое поглощение при длине волны 492 нм.

Минимальную детектируемую концентрацию токсина определяли по формуле:

$$\bar{A}_0 + 3 \cdot SD,$$

где \bar{A}_0 – среднее значение величин оптической плотности в лунках, не содержащих токсин; SD – среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения A_0 .

SD вычисляли по формуле:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_0 - \bar{A}_0)^2}{n-1}},$$

где \bar{A}_0 – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, не содержащих токсин; n – число измерений. В большинстве экспериментов $n = 3$.

Получение конъюгатов моноклональных антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli* с микросферами.

Конъюгирование связывающих антител с микросферами проводили согласно с протоколом для конъюгации таких реагентов с помощью sulfo-NHS/EDC, предложенным компанией Lumindex.

Для конъюгации со связывающими антителами к СТ использовали микросферы с номером ID 29, а для конъюгации со связывающими антителами к LT – микросферы с номером ID 36. Количество конъюгированных микросфер подсчитывали с помощью микроскопа в камере Горяева.

Анализ эффективности конъюгации микросфер со связывающими антителами к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*

Эффективность конъюгации микросфер со связывающими антителами оценивали по величине интенсивности медианного флуоресцентного сигнала, регистрируемого в спектральной области соответствующего ID используемых микросфер.

Препарат микросфер, конъюгированных с различными количествами (1, 5 и 25 мкг) антител, суспендировали и обрабатывали ультразвуком в течение 20 сек. Полученную (стоковую) суспензию микросфер разводили до концентрации 6×10^5 микросфер в 1 мл и вносили в лунки планшета с фильтрующим дном MABVIN1250 plate (Millipore, США). Антимышинные антитела, меченные фикоэритрином, разводили PBS-BSA до концентрации 6 мкг/мл. Из препарата готовили троичные разведения, каждый разведенный препарат вносили в лунки, содержащие микросферы, конъюгированные с антителами. После инкубации супернатант из всех лунок одновременно удаляли при помощи вакуумного насоса со специальной насадкой для планшетов с фильтрующим дном (Millipore, США). После промывок микросферы суспендировали PBS для анализа на проточном анализаторе Lumindex 200.

Подбор оптимальных концентраций биотинилированных (детектирующих) антител для количественного определения холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli* методом хМАР-анализа

Препарат микросфер, конъюгированных с различными количествами (1, 5 и 25 мкг) связывающих антител к СТ или LT, суспендировали и обрабатывали ультразвуком как описано выше. В полученной суспензии концентрацию микросфер доводили до $1,8 \times 10^5$ в 1 мл и помещали по 30 мкл в лунки планшета с фильтрующим дном. Далее в лунки добавляли 30 мкл токсина в концентрациях 30, 300 и 3000 пг/мл. В эти же лунки вносили по 30 мкл соответствующих биотинилированных антител в концентрациях 0,5; 1,0; 2,0 и 4,0 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании в темноте при комнатной температуре. После инкубации лунки планшета промывали трижды PBS-BSA, затем в них вносили по 100 мкл коммерческого препарата стрептавидина, меченного фикоэритрином. Планшет инкубировали в течение 30 мин при постоянном перемешивании в темноте при комнатной температуре. По окончании времени инкубации лунки планшета промывали трижды PBS-BSA и однократно PBS. После промывок микросферы суспендировали в 100 мкл PBS и анализировали на проточном лазерном анализаторе Luminesx 200.

Определение минимальной детектируемой концентрации холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli* в мультиплексном «сэндвич»-хМАР-анализе

Препараты микросфер, конъюгированные со связывающими антителами к СТ и LT суспендировали и обрабатывали ультразвуком. Суспензии микросфер, конъюгированные со связывающими антителами к СТ и LT, смешивали таким образом, чтобы в общем объеме концентрация микросфер каждого типа составляла 6×10^5 микросфер/мл. Полученную суспензию обоих типов микросфер помещали по 50 мкл в лунки планшета с фильтрующим дном. Холерный токсин и термолабильный энтеротоксин *E. coli* смешивали таким образом, чтобы в общем объеме PBS-BSA их концентрация составляла 320 и 800 пг/мл соответственно. Делали двоичные разведения в круглодонном планшете и вносили соответствующие разведения токсинов по 50 мкл в лунки, содержащие микросферы. Планшет инкубировали при постоянном перемешивании в темноте в течение часа при комнатной температуре. Далее лунки планшета промывали трижды PBS-BSA. В лунки вносили по 100 мкл раствора, содержащего био-

тинилованные антитела к LT и СТ, разведенные в PBS-BSA в оптимальных концентрациях (2 мкг/мл для обоих токсинов). Планшет инкубировали при постоянном перемешивании в темноте в течение 1 ч при комнатной температуре. По окончании времени инкубации лунки планшета промывали трижды и добавляли по 100 мкл коммерческого препарата стрептавидина, меченного фикоэритрином. Последующие стадии инкубации, отмывки и анализа на проточном лазерном анализаторе проводили также как при подборе оптимальных концентраций биотинилированных (детектирующих) антител для количественного определения холерного токсина и термолабильного энтеротоксина *E. coli* методом хМАР-анализа (см. выше).

Минимальную детектирующую концентрацию определяли как самую низкую концентрацию с флуоресцентным сигналом, превышающим более чем на три стандартных отклонения среднее значение фонового флуоресцентного сигнала. Стандартное отклонение среднего значения фонового сигнала вычисляли по формуле:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_0 - \bar{A}_0)^2}{n-1}},$$

где \bar{A}_0 – среднее арифметическое значение медианного флуоресцентного сигнала в лунках, не содержащих токсин; n – число измерений; $n = 3$.

Подготовка образцов для определения в них токсинов методом «сэндвич»-ИФА в формате планшета и хМАР-анализа

Для определения СТ и LT в биологических образцах, препараты токсинов разводили BSA-PBS до концентрации 1 мкг/мл. Полученные растворы разводили не содержащими токсинов образцами молока, мясного бульона, воды, носоглоточных смывов до концентрации 1 нг/мл для СТ и 10 нг/мл для LT. Образцы с токсинами подвергали центрифугированию при 5000 g в течение 5 мин. Для анализа отбирали интерфазу, переносили в лунки круглодонного планшета и делали двоичные и троичные разведения (СТ – от 1 до 0,01 нг/мл, LT – 10 до 0,1 нг/мл). Для хМАР-анализа подготовленные образцы, содержащие токсины, переносили по 50 мкл в лунки с конъюгатами связывающих антител с микросферами. Далее проводили определение токсинов по вышеприведенному методу.

Для определения СТ или LT в воде, молоке и мясном бульоне методом «сэндвич»-ИФА в формате планшета 100 мкл токсина в различных концентрациях (от 1 мкг до 0,1 нг/мл) вносили в лунки

планшета и инкубировали в буфере, содержащем 10% воды из открытого водоема, коммерческого молока или мясного бульона. Далее проводили определение по методу «сэндвич»-варианта ИФА в формате планшета, описанному выше.

Для получения образца смыва со слизистой носоглотки человека использовали тампон из синтетического негигроскопичного материала. С помощью тампона собирали со слизистой носоглотки биоматериал. Тампон тщательно отмывали в 1 мл рабочего раствора PBST для «сэндвич»-ИФА или в 1 мл BSA-PBS для МИА, центрифугировали (5000 g) при комнатной температуре в течение 5 мин и анализировали на содержание токсинов.

Результаты и обсуждение

Успех в получении гибридом — продуцентов моноклональных антител — определяется, прежде всего, эффективной схемой иммунизации животных (обычно мышей) — доноров иммунных лимфоцитов, являющихся партнерами при слиянии с клетками миеломы. Были выбраны короткие схемы иммунизации, инициирующие развитие локального иммунного ответа. Для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli*, были использованы клетки миеломы SP2/0 — плазмцитомной клеточной линии, не секретирующей иммуноглобулины, и лимфоциты, выделенные из подколенных лимфоузлов мышей линии BALB/c конвенциональной категории с естественной микрофлорой и категории SPF (specific pathogen free), свободных от патогенной микрофлоры [11]. Мышей иммунизировали токсином СТ фирмы Sigma и LT, выделенным из клеток *E. coli* штамм YM107, трансформированных плазмидой pLT, содержащий ген с полной последовательностью LT. Токсины вводили в подушечки задних лапок в присутствии неполного адьюванта Фрейнда (НАФ). Основанием такого выбора адьюванта послужила имеющаяся в литературе информация о том, что холерный токсин, а также термолабильный энтеротоксин *E. coli* обладают ярко выраженными свойствами адьюванта [12, 13]. Агентом, способствующим соматической гибридизации клеток, выбран полиэтиленгликоль 4000.

Данные схемы иммунизации не обеспечивали очень высоких титров специфических антител в сыворотке крови, однако формирование лимфоцитов — предшественников плазматических клеток в лимфоузлах происходило в достаточной степени для получения гибридом, стабильно продуцирующих антитела в высоких титрах в культуральной жидкости, где титр составлял не менее 1 : 20 000. От-

бор жизнеспособных гибридом проводили по стандартной схеме в культуральной среде, содержащий НАТ [8].

Скрининг клонов-продуцентов осуществляли методом непрямого ИФА. Для СТ и LT уже на первом этапе отбора целевых клонов был проведен перекрестный скрининг с целью исключения из дальнейшей работы клонов гибридом, способных продуцировать антитела к общим антигенным детерминантам этих токсинов. После проведения первого скрининга клоны гибридом, продуцирующие специфические антитела к СТ или LT, подвергались клонированию методом последовательных разведений и повторному скринингу. Следует отметить, что число клонов, продуцирующих антитела, детектирующие оба токсина, было значимым и составляло более 30% от общего количества. В результате гибридизации лимфоцитов мышей конвенциональной категории, иммунизированных LT, было получено 7 гибридных клонов, а мышей категории SPF – 8 клонов, стабильно продуцирующих специфические МА, не связывающиеся с СТ. В результате гибридизации лимфоцитов мышей конвенциональной категории, иммунизированных СТ, было получено 14 клонов, не детектирующих LT, а гибридизации лимфоцитов мышей категории SPF – 20 клонов [11].

Характеристика МА к СТ и LT включала изотипирование и определение типа тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Изотипирование проводили в соответствии с рекомендацией к коммерческому набору для изотипирования мышинных иммуноглобулинов. Результаты представлены в таблицах 1 и 2. В этих же таблицах представлены величины констант аффинности антител $K_{\text{афф}}$, определенные методом Битти [10]. Величины констант аффинности МА к СТ варьируют от $0,11 \times 10^9$ до $2,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$; МА к LT от $0,16 \times 10^9$ до $2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Для определения констант использовали высокоочищенные препараты антител, выделенные из асцитной жидкости мышей, привитых клетками гибридом.

Как следует из приведенных в табл. 1 и 2 данных, все моноклональные антитела относятся к иммуноглобулинам класса G, подклассам IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3, что обеспечило определенные преимущества в выборе метода очистки этих антител с помощью иммуноаффинной хроматографии на протеин-А-сефарозе. Все полученные антитела имели легкую цепь κ -типа. В результате очистки получили электрофоретически чистые препараты антител (рис. 1), пригодные для получения их биотинилированных производных.

Одним из методов выявления бактериальных токсинов в аналитических концентрациях является «сэндвич»-вариант ИФА. В данном формате высокая чувствительность достигается применением

Таблица 1. Характеристики моноклональных антител к термолабильному энтеротоксину *E. coli*

Гибридный клон	Тип тяжелой цепи	$K_{\text{афф}} \times 10^9 \text{ M}^{-1}$
E11F4	IgG ₁	0,16 ± 0,02
D11H11	IgG ₁	0,24 ± 0,03
2F4D9	IgG ₁	0,40 ± 0,04
G2H4	IgG ₁	0,27 ± 0,02
F5G2	IgG ₁	1,50 ± 0,04
F8F6	IgG ₁	1,80 ± 0,04
1B1G6F2	IgG ₃	0,50 ± 0,02
D12B9	IgG ₁	0,30 ± 0,01
D2E4	IgG ₁	0,30 ± 0,02
B11G11	IgG ₁	2,00 ± 0,04

двух МА-связывающих и детектирующих антител к различным эпитопам молекулы токсина. Связывающие антитела иммобилизованы на поверхности лунок планшета, а детектирующие представляют собой меченые биотином антитела. Для мечения детектирующих МА использовали сукцинимидный эфир биотина.

С целью подбора пары антител, позволяющей в «сэндвич»-ИФА выявлять СТ и LT с высокой чувствительностью, все полученные антитела (табл. 1 и 2) тестировали как в качестве связывающих, так и в качестве детектирующих антител. Для этого каждое из полученных антител было биотинилировано. Таким образом, все антитела были представлены в нативном виде и в виде биотинилированных производных.

Из полученных спектров антител подбирали пары, позволявшие выявлять холерный токсин или термолабильный энтеротоксин *E. coli* с минимальной детектируемой концентрацией (МДК) менее 1 нг/мл. Данная величина МДК соответствует пределу детекции коммерческой тест-системы СТ и LT VET-RPLA detection kit (Oxoid) [14]. Отобранные пары МА в отсутствие токсина не связывались друг с другом и, таким образом, не формировали в пробах значимого неспецифического фона. Данные пары антител не взаимодействовали с LT или СТ соответственно. Пары таких антител приведены в табл. 3 и 4.

Таблица 2. Характеристика моноклональных антител к холерному токсину [11]

Клон	Типы тяжелой цепи	$K_{\text{афф}} \times 10^9 \text{ M}^{-1}$
A2B1	IgG ₁	0,42 ± 0,04
A6B9	IgG ₃	0,53 ± 0,04
A7G3	IgG ₃	0,21 ± 0,02
A11E3	IgG _{2a}	0,74 ± 0,06
B1F8	IgG ₁	0,25 ± 0,04
C2B4	IgG ₃	2,2 ± 0,1
C5H10	IgG ₁	1,1 ± 0,1
C7F11	IgG ₃	2,9 ± 0,2
C10F10	IgG ₁	0,12 ± 0,02
D3D8	IgG _{2a}	1,4 ± 0,1
D4D6	IgG _{2b}	0,33 ± 0,03
D5C3	IgG ₃	1,2 ± 0,1
D6G7	IgG _{2b}	0,11 ± 0,01
D7F11	IgG ₁	0,22 ± 0,02
E3B6	IgG ₁	0,13 ± 0,02
E6E10	IgG ₁	0,52 ± 0,03
F4F4	IgG ₁	1,3 ± 0,4
F5H3	IgG ₁	2,6 ± 0,1
G6D12	IgG ₁	0,62 ± 0,04
G7D8	IgG ₁	2,70 ± 0,15
H4B6	IgG ₁	0, 51 ± 0,03
H5E10	IgG ₁	0,35 ± 0,04
H5G8	IgG ₃	0,45 ± 0,05
H8F8	IgG ₃	0,30 ± 0,02

Для определения чувствительности «сэндвич»-варианта ИФА детекции СТ или LT использовали двоичные и троичные разведения токсинов в буфере в интервале концентрации от 1 мкг/мл до 0,1 нг/мл. МДК токсинов определяли как концентрацию, соответствующую значению оптического поглощения, превышающего не менее чем на три стандартных отклонения оптическое поглощение



Рис. 1. Электрофореграмма моноклональных антител к СТ В1F8 и к ЛТ F5G2 (дорожка 1 и 2 соответственно) в 12,5%-ом ПААГ-SDS в восстанавливающих условиях. На дорожке 3 представлена электрофореграмма смеси стандартных белков: фосфоорилаза В (97 кДа), альбумин (66 кДа), овальбумин (45 кДа), карбоангидраза (30 кДа), ингибитор трипсина (20,1 кДа) и α -лактальбумин (14,4 кДа)

многократно измеренной нулевой точки (в отсутствии токсина). Пары антител оценивали по соответствующим величинам МДК.

Как видно из представленных в таблице 3 данных, пары антител F5H3-D6G7biot, F5H3-E6E10biot и F5H3-B1F8biot выявляют СТ с нижним пределом детекции 0,2 нг/мл токсина. При использовании антител D6G7, E6E10, B1F8 в качестве связывающих и антител F5H3 в качестве детектирующих МДК СТ увеличивается и составляет более 1 нг/мл холерного токсина. Следует отметить, что константа аффинности для антител F5H3 (см. табл. 2) значительно выше, чем для D6G7, E6E10 и B1F8, что, по-видимому, определяет позицию МА F5H3 в качестве связывающего в «сэндвич»-анализе [11].

Как следует из данных таблицы 4, в тест-системе определения ЛТ методом «сэндвич»-ИФА в качестве детектирующих используются антитела F5G2, 1B1G6F2, B11G11 и G11F12 с наименьшими величинами МДК. Они составляют пары со многими связывающими антителами и определяют ЛТ с минимальными значениями МДК

Таблица 3. Пары моноклональных антител, выявляющие в «сэндвич»-анализе холерный токсин в концентрации ниже 1 нг/мл [11]

Связывающие антитела	Детектирующие антитела	МДК СТ, нг/мл
B1F8	B1F8biot	0,4
D4D6	D6G7biot	0,4
	E6E10biot	0,4
D7F11	D6G7biot	0,4
	B1F8biot	0,4
F4F4	E6E10biot	0,4
	B1F8biot	0,8
H4B6	D6G7biot	0,4
F5/H3	B1F8biot	0,2
	E6E10biot	0,2
	D6G7biot	0,2
G7D8	D6G7biot	0,4
	B1F8biot	0,4
	E6E10biot	0,4
H8F8	D6G7biot	0,4
	E6E10biot	0,4

(менее 1 нг/мл). Антителам F5G2, 1B1G6F2, B11G11 и G11F12 присущи самые высокие константы аффинности (табл. 1) порядка 10^9 M⁻¹. Минимальный предел детекции LT составляет 0,4 г/мл для пар B11G11-F5G2biot, E11F4-F5G2biot, F5G2-B11G11biot, D2E4-B11G11biot и B11G11-B11G11biot соответственно. В этих парах связывающие антитела также имеют высокие константы аффинности.

Разработанная тест-система позволяет детектировать СТ и LT в меньшей концентрации, чем МДК коммерческой тест-системы VET-RPLA detection kit (Oxoid) [10], используемой для детекции СТ и LT методом непрямой пассивной латексной агглютинации, позволяющий определять энтеротоксины в концентрации 1–2 нг/мл. Следует отметить отсутствие перекрестного связывания МА к СТ с термолабильным энтеротоксином *E. coli* (LT), а антител к LT с холерным токсином. Значения МДК известной иммуноферментной тест-системы дифференцированной детекции СТ и LT с применением пар, составленных из моноклональных и поликлональных антител, составляет 0,1 нг/мл [15]. Нами получены пары, составленные из

Таблица 4. Пары моноклональных антител, выявляющие в формате «сэндвич»-ИФА термолabileный энтеротоксин *E. coli*, с чувствительностью ниже 1 нг/мл

Связывающие антитела	Детектирующие антитела	Нижний предел детекции ЛТ, нг/мл
E11F4		0,4
2F4D9		0,4
G2H4		0,8
F8F6	F5G2biot	1,1
1B1G6F2		0,3
D12B9		0,9
B11G11		0,4
E11F4		0,4
2F4D9		0,9
G2H4		0,6
F5G2	1B1G6F2biot	0,4
F8F6		0,5
1B1G6F2		0,6
B11G11		0,5
E11F4		1,1
D11H11		0,6
G2H4		0,4
F5G2		0,5
F8F6	B11G11biot	0,8
1B1G6F2		0,6
D12B9		0,9
D2E4		0,5
B11G11		0,5
E11F4		0,5
2F4D9		0,4
G2H4	G11F12biot	0,4
F5G2		1,0
F8F6		0,4

моноклональных антител, позволяющие детектировать СТ и ЛТ в буфере с МДК, сравнимой с МДК вышеназванной тест-системы, а именно 0,2 нг/мл для СТ и 0,4 нг/мл для ЛТ.

Полученные высокочувствительные и моноспецифические МА к ЛТ и СТ дали возможность разработки биплексной иммунофлуоресцентной тест-системы на основе хМАР-технологии.

Разработанная тест-система на основе хМАР-технологии является разновидностью «сэндвич»-варианта ИХА-метода, в котором связывающие антитела иммобилизованы на твердом носителе – полистирольных гранулах (микросферах) диаметром 5,6 мкм. Используемые в этом методе микросферы уникальны по спектральным характеристикам, обусловленным комбинацией внутренних флуорофоров. Детектирующие антитела – вторые из подобранной пары – мечены фикоэритрином. Детекцию флуоресцентной метки проводили, используя компактный проточный флуоресцентный анализатор (Luminex 200) с программным обеспечением для обработки результатов Luminex IS 2.3 [16].

При разработке биплексной тест-системы на первом этапе работы исследовали пригодность отобранных методом «сэндвич»-ИФА пар МА в х-МАР-анализе. Для разработки тест-системы на основе хМАР-анализа использовали 3 пары антител к СТ (F5H3-B1F8biot, F4F4-B1F8biot, F4F4-E6E10biot) и 5 пар антител к ЛТ (E11F4-F5G2biot, E11F4-1B1G6F2biot, E11F4-B11G11biot, F5G2-1B1G6F2biot и F5G2-B11G11biot) [16].

Ключевой стадией в хМАР-технологии является получение высокоэффективного конъюгата микросфер со связывающими антителами. Связывающие МА к токсинам иммобилизовали на поверхности карбоксилированных полистирольных частиц карбодиимидным способом. При разработке тест-системы для определения холерного токсина использовали карбоксилированные микросферы хМАР 129, имеющие спектральный адрес (ID) 29. В качестве связывающих СТ антител использовали F5H3 и F4F4. Для определения ЛТ применяли карбоксилированные микросферы хМАР 136 (ID36). В качестве связывающих ЛТ антител использовали МА E11F4 и F5G2.

Для каждого МА подбирали оптимальные условия конъюгации. С этой целью конъюгацию микросфер проводили с различными количествами МА (25, 5 и 1 мкг). Эффективность процесса конъюгации микросфер с различными количествами связывающих антител оценивали по интенсивности медианного флуоресцентного сигнала полученного комплекса с поликлональными кроличьими антитышиными иммуноглобулинами, мечеными фикоэритрином. Каждая анализируемая проба характеризовалась значениями интенсивности

медианного флуоресцентного сигнала (MFI), представляющего собой среднее значение интенсивности флуоресценции 100 анализированных микросфер. Для выявления конъюгата микросфер со связывающими антителами с максимальной интенсивностью медианного флуоресцентного сигнала изучали зависимость сигнала от различных концентраций поликлональных кроличьих антимышиных меченных фикоэритрином иммуноглобулинов.

Максимальную интенсивность флуоресценции при минимальном неспецифическом фоне наблюдали для микросфер, конъюгированных с антителами F4F4 и F5H3 в количестве 1 и 5 мкг, а для антител E11F4 и F5G2 – 1 мкг.

Проведение экспериментов по определению оптимального количества связывающих антител конъюгированных с микросферами, является обязательным для характеристики эффективности конъюгации.

На следующем этапе работы для отобранных конъюгатов связывающих антител с микросферами осуществляли подбор оптимальных концентраций детектирующих антител, меченных биотином.

В экспериментах использовали четыре концентрации биотинилированных антител – 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 мкг/мл и три концентрации токсина – 30, 300 и 3000 пг/мл. Максимальную интенсивность флуоресценции при минимальном неспецифическом фоне наблюдали при концентрации детектирующих антител B1F8 2 мкг/мл, для антител E6E10 – 4 мкг/мл, для F5G2 – 2 мкг/мл, а для 1B1G6F2 – 1 мкг/мл.

В табл. 5 приведены оптимальные количества связывающих антител, использованных в конъюгации с микросферами ID29 и ID36, и оптимальные концентрации детектирующих антител, определяющие максимальную интенсивность медианного флуоресцентного сигнала.

Определяли минимальную детектируемую концентрацию токсинов в буфере PBS-BSA в индивидуальном анализе и биплексном анализе. Микросферы с иммобилизованными на них специфическими МА к СТ и LT инкубировали с этими токсинами в различных концентрациях. МДК была определена в соответствии с общепринятым стандартом как концентрация, вызывающая флуоресцентный сигнал аналита среднего уровня, превышающий среднее значение фонового сигнала флуоресценции на три стандартных отклонения. В табл. 6 приведены величины МДК СТ и LT.

Самое низкое значение МДК для СТ (10 пг/мл) было определено с использованием антител: связывающие антитела F4F4, конъюгированные с микросферами, работающие в паре с детектирующими антителами B1F8biot, и связывающие антитела F5H3, конъюгиро-

Таблица 5. Пары МА, отобранные для xMAP-анализа токсинов СТ и LT

Токсин	Область ID	Связывающие антитела		Детектирующие антитела	
		Клон	Количество антител, иммобилизованных на микросферах, мкг	Клон	Концентрация биотинилированных антител, мкг/мл
СТ	36	F4F4	1	B1F8	2
			5	E6E10	4
		F5H3	1	B1F8	2
LT	29	E11F4	1	F5G2	2
			1	1B1G6F2	1
		F5G2	1	1B1G6F2	1

Таблица 6. Минимальные детектируемые концентрации СТ и LT, определенные в xMAP-анализе с участием различных пар связывающих антител, иммобилизованных на микросферах, и детектирующих антител

Токсин	Антитела, конъюгированные с микросферами	Детектирующие антитела, несущие биотиновую метку	МДК, пг/мл
СТ	F5F3	B1F8	10
	F4F4	E6E10	20
	F4F4	B1F8	10
LT	E11F4	F5G2	80
	E11F4	1B1G6F2	160
	F5G2	1B1G6F2	100

ванные с микросферами, работающие в паре с детектирующими B1F8biot. В дальнейшей работе была использована пара антител F4F4 с биотинилированными B1F8. При определении МДК термолабильного энтеротоксина *E. coli* наибольшая чувствительность была показана для связывающих антител E11F4, конъюгированных с микросферами, работающих в паре с детектирующими F5G2biot.

Для указанных выше пар с минимальными значениями МДК СТ и LT был проведен биплексный анализ. Результаты представлены на рис. 2.

Из приведенных данных следует, что МДК СТ превышает МДК ЛТ, что согласуется с данными, полученными при хМАР-анализе этих двух токсинов, проведенном индивидуально. В биплексном формате показатели, соответствующие фоновому сигналу флуоресценции, не превышали аналогичные показатели, полученные при проведении хМАР-анализа токсинов индивидуально. В табл. 7 представлены значения МДК для СТ и ЛТ, регистрируемые в тест-системах формата хМАР-анализа и «сэндвич»-ИФА.

Из данных таблицы следует, что МДК токсинов, определенные в биплексном и индивидуальном анализе, не различаются, однако они существенно ниже величин МДК токсинов, определенных с помощью «сэндвич»-ИФА в формате планшета.

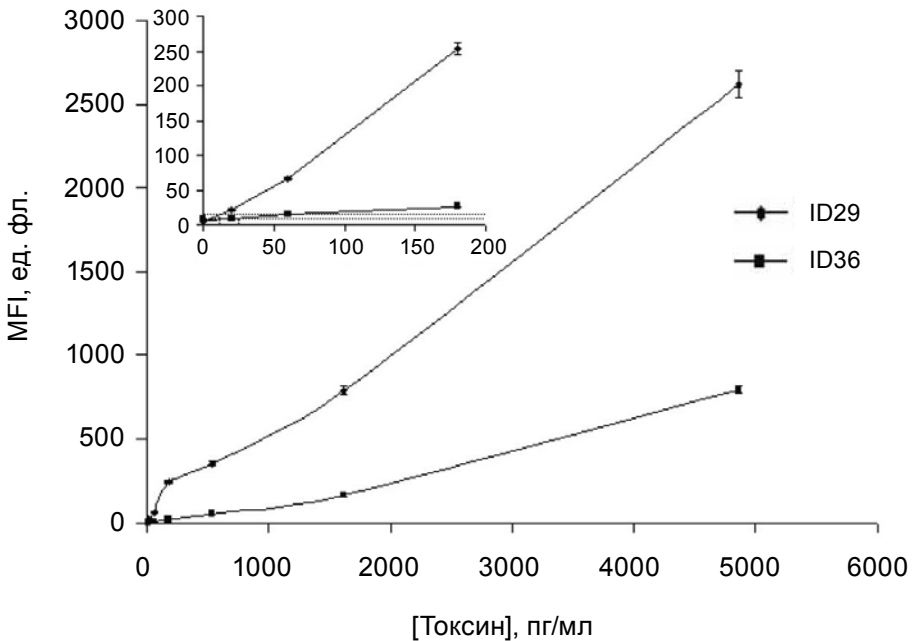


Рис. 2. Зависимость интенсивности медианного флуоресцентного сигнала от концентрации СТ и ЛТ в хМАР-анализе, проведенном с участием пулов микросфер, конъюгированных с F4F4 и с E11F4, и с пулами детектирующих антител V1F8biot и F5G2biot. На врезке приведен калибровочный график, соответствующий области низких концентраций токсинов. Пунктирной линией обозначено значение флуоресцентного сигнала, превышающее среднее значение флуоресцентного сигнала нулевой пробы на три стандартных отклонения. Концентрация СТ и ЛТ при этих значениях флуоресцентного сигнала соответствует минимальной детектируемой концентрации

Таблица 7. Минимальные концентрации (нг/мл) холерного токсина и термолабильного энтеротоксина E. coli, детектируемые в биплексном иммунофлуоресцентном анализе с применением xMAP-технологии и в «сэндвич»-ИФА в формате планшета

Токсин	МДК токсина в индивидуальном анализе	МДК токсина в мультиплексном анализе	МДК токсина в «сэндвич»-ИФА
СТ	0,01	0,01	0,2
LT	0,08	0,08	0,4

Было проведено сравнительное определение МДК токсинов LT и СТ в модельном буфере и в различных образцах объектов окружающей среды, продуктах питания и носоглоточных смывах человека методами «сэндвич»-ИФА в формате планшета и иммунофлуоресцентном анализе с применением xMAP-технологии. Результаты представлены в табл. 8.

Из представленных данных следует, что чувствительность определения холерного токсина в молоке, бульоне, воде и в смывах носоглотки сравнима с чувствительностью определения токсина в модельном буфере. Значения МДК в биплексном анализе на два порядка превышают аналогичные значения, определенные в «сэндвич»-ИФА. Для LT наблюдается увеличение значений МДК в молоке и в бульоне по сравнению с величиной в контрольном буфере. МДК, определенные в воде и в смывах со слизистой носоглотки человека, сравнимы с МДК, определенной в контрольном буфере. Значения

Таблица 8. Минимальные детектируемые концентрации (нг/мл) холерного токсина и термолабильного энтеротоксина E. coli в буфере, молоке, бульоне, смывах со слизистой носоглотки человека и в воде из открытого водоема, определенные методами «сэндвич»-ИФА в формате планшета и биплексного анализа с применением xMAP-технологии

Токсин		PBS-BSA	Молоко	Бульон	Вода	Носоглоточные смывы
МДК	ИФА	0,2	0,2	0,2	0,2	0,30
СТ	xMAP	0,01	0,02	0,02	0,02	0,09
МДК	ИФА	0,4	9,6	6,8	2,0	8,0
LT	xMAP	0,08	3,0	1,0	0,1	0,8

МДК LT в биплексном анализе превышают, в основном, на порядок, соответствующие величины МДК, полученные методом сэндвич-ИФА. Данная мультиплексная тест-система позволяет определять токсины и в различных биологических жидкостях, в объектах окружающей среды и в продуктах питания. Содержание СТ в молоке, мясном бульоне, в смывах с носоглотки можно определять с такой же чувствительностью и для модельного буфера.

Таким образом, биплексная иммунофлуоресцентная тест-система на основе xMAP-технологии для одновременной детекции СТ и LT создана нами в России впервые.

GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST CHOLERA TOXIN AND HEAT LABILE ENTEROTOXIN OF *E. coli* WITH THE AIM OF DEVELOPMENT OF THE TOXINS DIPLEX ANALYSIS IN ENVIRONMENTAL SPECIMENS

E. V. Grishin, T. I. Valyakina

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

The present study focuses on development of monoclonal antibodies (MAbs) which specifically interact with cholera toxin (CT) or heat labile enterotoxin of *E. coli* (LT). Such MAbs are possessed of ability to identify CT or LT in different immunochemical assays. We obtained hybridoma clones which produced MAbs of IgG isotypes to CT and LT. On application of the method of serial dilutions we selected the clones which produced MAbs with specific activity against only one of the toxins. We found the 16 pairs of MAbs to CT and 28 ones to LT. By means of these MAbs it was possible to realize the quantitative analysis of these toxins in sandwich immunoassay (ELISA) and diplex sandwich xMAP assay. The limits of detection (LODs) of CT and LT in ELISA in control buffer were 0.2 and 0.4 ng/ml, respectively, and in xMAP assay – 0.01 and 0.08 ng/ml, respectively. In probes of cow milk, meat soup, pond water and nasopharyngeal washes CT was detected in the both assays with the same LODs, but LT LODs were above the LODs in control buffers.

Литература

1. *Супотницкий М. В.* Микроорганизмы, токсины и эпидемии. – М.: Вузовская книга, 2000. – 376 с.
2. *Dallas W. D., Falkow S.* Amino acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin // *Nature*. – 1980. – **288**. – P. 499–501.
3. *Davy Vanden Broeck, Caroline Horvath, Marc J. S. De Wolf* Vibrio cholerae: Cholera toxin // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – **39**(10). – P. 1771–1775.

4. *Определение «остаточной» токсигенности штамма холерного вибриона в лигированных петлях тонкого кишечника взрослых кроликов. Приложение 7. Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона. – Методические указания. МУ 3.3.1.2075-06.*
5. *Donta S. T., Moon H. W., Whipp S. C. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture // Science. – 1974. – 183. – P. 334–336*
6. *Lim D. V., Simpson J. M., Kearns E. A., Kramer M. F. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare // Clin. Microbiol. Rev. – 2005. – 18. – P. 583–607.*
7. *Andreotti P. E., Ludwig G. V., Peruski A. H. et al. Immunoassay of infectious agents // Biotechniques. – 2003. – 35(4). – P. 850–859.*
8. *Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. – 1975. – 256(5517). – P. 495–497.*
9. *Laemmly U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227. – P. 680–685.*
10. *Beatty J. D., Beatty B. G., Vlahos W. G. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay // J. Immunol. Methods. – 1987. – 100. – P. 173–179.*
11. *Петрова Е. Э., Комалева Р. Л., Лахтина О. Е. и др. Получение и характеристика моноклональных антител к холерному токсину // Биоорганическая химия. – 2009. – 35(3). – P. 357–367.*
12. *Clements J. D., Dickinson B. L. Use of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as an oral adjuvant / Mucosal Vaccines, Kyono H., Ogra P. L., McGhee J. R., eds. – Academic, London and New York, 1996. – P. 73–87.*
13. *Bowman C. C., Clements J. D. Differential Biological and Adjuvant Activities of Cholera Toxin and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Hybrids // Infect Immun. – 2001. – 69(3). – P. 1528–1535.*
14. *VET-RPLA toxin detection kit / OXOID manual. 9-th edition compiled by E. Y. Bridson. – 2006. – P. 1039–1042.*
15. *Honda T. Sato M., Miwatani T. Differential detection of cholerae enterotoxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assays with antibodies specific to the two toxins // J. Clin. Microbiol. – 1984. – 20. – P. 664–667.*
16. *Simonova M. A., Valyakina T. I., Petrova E. E. et al. Development of xMAP Assay for Detection of Six Protein Toxins // Anal. Chem. – 2012. – 84. – P. 6326–6330.*

IMMUNOBIOLOGY OF DIPHTHERIA. RECENT APPROACHES FOR THE PREVENTION, DIAGNOSIS, AND TREATMENT OF DISEASE

D. KOLYBO, A. LABYNTSEV, S. ROMANIUK, A. KABERNIUK,
O. OLIINYK, N. KOROTKEVICH, S. KOMISARENKO

*Department of Molecular Immunology, Palladin Institute of Biochemistry,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kolibo@biochem.kiev.ua*

*Diphtheria is a highly contagious life-threatening disease caused by the toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*, which are transformed by a bacteriophage carrying the toxin gene. Diphtheria causative agent and its major virulence factor diphtheria toxin are well studied, but outbreaks of disease still occur worldwide. Rapid development of new methods in immunology and molecular biology is currently leading to improvement of prophylaxis, diagnosis and treatment of diphtheria. This review highlights the microbiological, epidemiological and immunological aspects of diphtheria infection, role of diphtheria toxin and others virulence factors in diphtheria pathogenesis and role of humoral anti-toxic immunity in the protection against disease. Perspectives in development of new diagnostic tests, anti-diphtheria vaccines, immunobiological preparations antidotes for prevention of diphtheria infection and other anti-diphtheria means was also discussed.*

Diphtheria is an acute infectious disease caused by the bacterium *Corynebacterium diphtheriae* (also known as Klebs-Löffler bacillus) [1]. Typically, diphtheria has respiratory or cutaneous localization. Respiratory diphtheria has various forms, usually restricted to upper respiratory tract: nasal, pharyngeal, tonsillar and laryngeal. As rule, main symptoms of respiratory diphtheria are sore throat, low fever, and an adherent membrane at the site of bacterial colonization [2]. Milder forms of diphtheria are often restricted to the skin [3].

Long time diphtheria was considered as well-controlled vaccine-preventable disease because it has largely been eradicated in all industrialized countries presumably through broad vaccination [4–6]. However, a diphtheria epidemic at the former Soviet Union territory at 1990s has again attracted the attention to incomplete understanding of the epidemiology, microbiology and especially immunobiology of this infection [7–12].

Today cases of diphtheria are still occur in Ukraine, Russia, and Latvia and also it is endemic in India, Indonesia, Nepal, Angola and Brazil, but only sporadic cases are reported in developed countries [11, 13–16]. However, the majority of the adult populations in Europe, Australia and

the United States have no immune protection against this infection [13, 17]. This issue draws renewed attention to the immunology of this infection, because lowered immunity levels within population can cause outbreaks of diphtheria.

Bacterial pathogenesis

Biological properties of *C. diphtheriae*. *C. diphtheriae* is an aerobic nonmotile, rod-shaped gram-positive bacillus, which can form metachromatic granules at the ends of the rod. Bacterial cells form irregular V-shaped aggregates resembling Chinese letters [1]. Species *C. diphtheriae* has three biotypes: *gravis*, *intermedius*, and *mitis*, which differ by the colony morphology and growth characteristics [18]. Genomic sequence of *C. diphtheriae* has been recently characterized [19] but molecular basis for differences in *C. diphtheriae* biotypes is not well defined and requires further investigation [20, 21]. The most severe diseases are often associated with the *gravis* biotype, but every strain has ability to produce toxin. Consequently, all isolated strains of *C. diphtheriae* should be tested in the laboratory for toxigenicity [22].

Besides *C. diphtheriae* there are two other species *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*, which can optionally produce diphtheria toxin and hence can cause respiratory illness resembling classical diphtheria [23–25]. It is worth noting that in recent years some severe infections caused by *C. ulcerans* have been recorded [26, 27]. Other well-known human pathogen *C. pseudodiphtheriticum* causes respiratory disease and is associated with high mortality in compromised hosts [28], however it is little known about the virulence factors and pathogenesis of such infections. Some other species of *Corynebacterium* are part of human normal flora, which are able to find niches in every suitable anatomic location of the host [29].

Most the clinical manifestations of diphtheria result from the action of an exotoxin produced by pathogen. Consequently, diphtheria toxin (DT) produced by toxigenic strains of *C. diphtheriae* is considered as the main pathogenic factor of infection. Toxigenicity of *C. diphtheriae* is controlled by bacteriophage conversion [30–32]. Thus toxin production occurs only when the bacterium is infected by lysogenic corynebacteriophage carrying the toxin gene encoding DT.

Production of DT by toxinogenic *C. diphtheriae* is strictly repressed by high concentrations of iron ions from the extracellular environment. The main source of the iron at site of bacterial colonization is the red blood cells, which appear from the bleed via damaged mucous epithelium [33]. The chromosomally encoded diphtheria toxin repressor DtxR depends on iron ions as a co-repressor factor [34]. The iron bound form of DtxR binds

to DNA sequence and prevents initiation of transcription of bacteriophageal *tox* gene. Hence, DtxR can be considered as iron-dependent transcriptional repressor [35]. In bacterial cell, DtxR regulates several chromosomally encoded genes, which encode products involved in iron utilization and acquisition [36, 37]. Some mutant forms of DtxR or iron-regulated promoters could constitutively repress the expression of diphtheria toxin gene, and phenotypically nontoxigenic strains may represent a potential reservoir for the emergence of toxigenic strains [38–40].

Strains of *C. diphtheriae* that do not produce diphtheria toxin are still frequently considered as non-virulent. Nevertheless, the association of nontoxigenic strains with localized disease is well known. There is opinion that nontoxigenic strains may be responsible for pharyngitis and should be treated [22, 41, 42]. However, additional studies are still required to obtain complete information about the pathogenicity or co-pathogenicity of nontoxigenic *C. diphtheriae* associated with cases of infection in the respiratory tract [43].

The introduction of a toxigenic strain of *C. diphtheriae* into a community may initiate an outbreak of diphtheria by bacterial spreading or by transfer of the bacteriophage to nontoxigenic strains carried in the respiratory tracts of susceptible human subjects. Both toxigenic and nontoxigenic strains of *C. diphtheriae* could be isolated during outbreak of infection, but the epidemiological role of nontoxigenic strains is under the question [44, 45].

Only toxigenic strains can cause respiratory diphtheria, conversely nontoxigenic strains can live in the organism without any clinical manifestation or cause some other pathologic states.

Recently, it was shown that nontoxigenic strains are associated with cases of invasive infection, particularly with endocarditis [46–48]. These microorganisms also can be associated with other invasive diseases, such as septic arthritis and osteomyelitis [49], or catheter-related infection [50].

The systemic diseases caused by *C. diphtheriae* often related to invasive clones. Invasive diseases add new aspects to the infectious processes caused by *C. diphtheriae*. Entry of *C. diphtheriae* by invasive processes can be caused by percutaneous trauma, skin and throat colonization. Unlike classical diphtheria, invasive disease caused by *C. diphtheriae* affects both vaccinated and non-vaccinated persons, and mostly induced by nontoxigenic isolates.

The patterns of adherence to HEp-2 cells (epidermoid carcinoma tissue from the larynx) of *C. diphtheriae* strains can be used to predict their invasive character [48, 51]. Invasive microorganisms yielded simultaneous expression of localized adherence-like and aggregative-like adherence pat-

terns to HEP-2 cells. Microbial adhesive properties may contribute to the spread and outcome of invasive processes.

Diphtheria toxin. Since the discovery of diphtheria toxin by Roux and Yersin in 1888 [52] it became one of the most extensively studied bacterial toxins. The minimal lethal dose of diphtheria toxin for humans and animals is below 0.1 mkg per kg of body weight [53]. The delivery of a single molecule of diphtheria toxin to the cell is sufficient to kill a eukaryotic cell [54].

Diphtheria toxin is an A-B type toxin consisting of two fragments: A (active) and B (binding) (Fig. 1). This protein consists of three domains: catalytic C-domain, trans-membrane T-domain and receptor-binding R-domain. C-domain encompasses the fragment A (SubA - subunit A), T-domain and R-domain together constitute the fragment B (SubB - subunit B) [55].

Receptor for DT (Fig. 2) is well characterized [56, 57]. Membrane-anchored precursor of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (pro-HB-EGF) binds with toxin with high affinity (K_d of approximately 10^{-8} – 10^{-9} M) [58]. DT is only one known natural ligand for pro-HB-EGF, which causes its internalization.

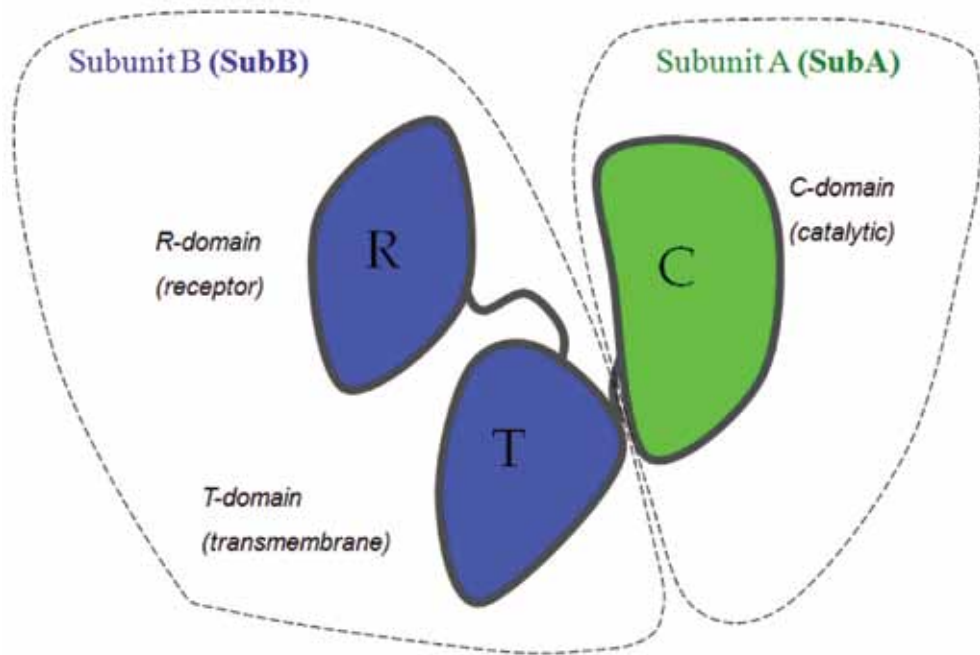


Fig. 1. Schematic structure of diphtheria toxin (DT)

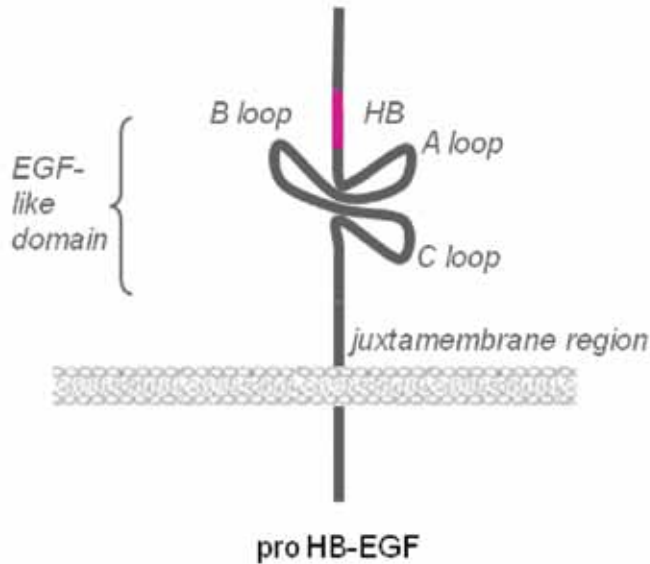


Fig. 2. Schematic structure of the DT receptor – heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) exposed on the cell surface in the form of profactor. (The Subunit B of DT binds to the EGF-like domain of HB-EGF)

HB-EGF is a member of the EGF family growth factors, which has high affinity for heparin and heparan sulfates [59]. Pro-HB-EGF is synthesized as type I transmembrane protein, which after processing by metalloproteases like ADAMs turns into soluble form (sHB-EGF). sHB-EGF acts as ligand for the EGF receptors of I and IV type, thus it is considered as a potent mitogen and chemoattractant for different cell types, including malignant cells.

The first step in intoxication of eukaryotic cells by diphtheria toxin is binding of the toxin to a specific cellular receptor pro-HB-EGF. The fragment B of DT is responsible for interaction with receptor on the cell surface and translocation of the fragment A across endosomal membrane into the cell cytosole. Two domains of fragment B have different functions. R-domain mediates binding of DT to its surface receptor, which promotes endocytosis of the toxin-receptor complex. T-domain facilitates C-domain translocation across lipid bilayer.

Upon endosome formation, endosomal low pH induces conformational changes that result in diphtheria toxin T-domain interaction with the endosomal membrane [60].

Thereafter T-domain mediates translocation of C-domain into the cell cytosol. Mechanism of C-domain translocation remains unclear, but

obvious that it depends on conformational switching of T-domain and its affinity to proteins in molten globule state.

After C-domain translocation across endosomal membrane, it restores the ability to inactivate eukaryotic translation elongation factor 2 (eEF2). Subunit A possesses ADP-ribosyl transferase activity and specifically inactivates eEF2. Accumulation of large number of inactivated eEF2 leads to inhibition of cellular protein biosynthesis and cell death [61].

The target of ADP-ribosylation by diphtheria toxin is unusual amino acid residue in eEF-2 diphthamide (a posttranslationally modified histidine). The diphthamide residue is unique to EF-2 from eukaryotes and Archea [62]. Synthesis of diphthamide is a complex process that requires the participation of several different proteins [63]. It has been suggested that ADP ribosylation of diphthamide in EF-2 may occur as a regulatory event in normal cellular physiology, but evidence for the precise physiological role of diphthamide in eukaryotes remains unknown [64]. Mutant cell lines that cannot produce diphthamide remain viable and are resistant to diphtheria toxin [65].

There are several important questions regarding DT functions remain to be investigated, like mechanism of translocation of the A fragment across endosomal membranes, mechanism of rodent toxin-resistance, the physiologic role of diphthamide residue of EF-2 in eukaryotic cells, as well as mechanism of immune recognition and protection mediated by toxin-specific antibodies etc.

Diphtheria toxin is responsible for the local cell damage at site of bacterial colonization as well as for distant toxic effect on peripheral nervous system, kidneys and heart. Apparently DT also helps bacteria to evade immune defense mechanisms and to escape from phagocytosis. Thus, DT and probably other surface structures of *C. diphtheriae* toxigenic strains show apoptogenic effect on mice peritoneal macrophages in vitro [66]. Small amounts of toxin can impair protein synthesis in both polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells from humans and guinea pigs [67]. DT could penetrate into phagocytes and B-cells specific to DT and kill these cells even if they derived from toxin-resistant animals [68]. This observation confirms that DT is potentially able to inhibit self-directed antibody response and phagocytosis and in this way escape from host defense mechanisms.

Additional bacterial virulence factors. Despite that the role of DT in bacterial virulence is well established, there are little known about other virulence factors of *C. diphtheriae*. These factors could be crucial for colonization of the host and recognition of corresponding host receptors since colonization is an essential step in pathogenesis. However, host cell receptors and invasion-associated proteins of the pathogen remains unknown.

On the HEP-2 cell system was shown distinct patterns of bacterium adherence: an aggregative, a localized and a diffuse [48, 51], which confirm an existence of several adhesion factors and different receptors on the host cell surface. Some bacterial adhesion factors have been recently characterized on the molecular level. Certain *C. diphtheriae* strains able to express three types of pili (SpaA, SpaB and SpaC) on its surface [69, 70], which are sufficient for adhesion to pharynx cells. There some additional proteins besides pili proteins involved in adhesion to larynx, pharynx and lung epithelial cells. For instance, *C. diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells [71]. In addition, the disruption of the *C. diphtheriae* DIP1621 gene leads to decreased adherence to epithelial cells [72]. DIP0733 (67-72p) may be directly implicated in bacterial invasion and apoptosis of epithelial cells in the early stages of diphtheria and *C. diphtheriae* invasive infection [73]. Non-fimbrial surface protein 67-72p also involved in adhesion to human erythrocytes. Iron supply has effect on binding properties of the microorganisms to erythrocytes as well as HEP-2 cells [74].

Number of studies suggesting the multifactorial mechanism of adhesion [75]. In addition, biofilm formation and fibrin deposition may contribute to the persistence of *C. diphtheriae* at the infected site [50].

Intracellular survivelance strategy. *C. diphtheriae* generally considered an extracellular colonizer. However, some strains of *C. diphtheriae* possess the ability to enter into cells and to survive within cultured cells [51, 76]. *C. diphtheriae* strains can adhere to epithelial cells and erythrocytes and has ability to survive within these cells. Probably, *C. diphtheriae* strains might use epithelial cells as an environmental niche supplying protection against antibodies and macrophages [71]. Some *C. diphtheriae* strains even without the *tox* gene exhibit strategies to survive within macrophages and to exert apoptosis and necrosis in human phagocytic cells [77]. Invasion of these cells is an active process; tetracycline-treated *C. diphtheriae* was still able to attach to host cells, but lost its ability to invade the cytoplasm [78]. As rule, the interaction between bacteria and macrophage determines the outcome of most infectious diseases.

The ability of diphtheria infectious agent to cause macrophage apoptosis is one of the mechanisms of realization of its pathogenic properties determined by the effect of diphtheria exotoxin, as well as its surface structures and pathogenicity enzymes. The presence of the *tox* gene influences the susceptibility of *C. diphtheriae* to human macrophages and the outcome of non-opsonic phagocytosis [77]. Analyses of molecular mechanisms of non-opsonic phagocytosis should lead to new approaches for the prevention of diphtheria and systemic *C. diphtheriae* infections. Homologous *C. diph-*

theriaetox⁺ and *tox*⁻ strains can survive within U-937 human macrophages but viable intracellular bacteria can be detected after 24 hr only for the *tox*⁻ strain.

Pseudomembrane formation and coagulase-like activity. The characteristic feature of disease is a pseudomembrane formation that usually covers the posterior pharynx and tonsils, which may also extend to the larynx and lower respiratory tract [2, 79]. Pseudomembrane of respiratory diphtheria is composed of fibrin matrix with incorporation of bacteria, necrotic epithelial and inflammatory cells, which adheres tightly to the underlying tissue [2]. The severity of the disease usually related to the extent of the local infection, although the potential role of these pseudomembranes in the maintenance of viable *C. diphtheriae* is still uncharacterized.

Although fibrin pseudomembrane is a characteristic feature of diphtheria, there is little known about the fibrinogen-binding properties and fibrin clot formation activity of *C. diphtheriae* strains and the role of the DT in these processes. The production of fibrinous exudates may play an important role in determining of the pseudomembrane formation. Diphtheria toxin generally considered as the major factor responsible for local cellular destruction and production of fibrinous exudates, suggesting that the presence of bacteriophages carrying the diphtheria toxin gene (*tox*) is essential for pseudomembrane formation. Recently reported property of *C. diphtheriae* iscoagulase-like activity. The capacity to bind to fibrinogen and to convert fibrinogen to fibrin may play a role in pseudomembrane formation and act as virulence determinants for both nontoxicogenic and toxicogenic strains [43].

Consequently, production of DT is important for the epithelial cell damage and production of fibrinous exudates, while coagulase-like activity of *C. diphtheriae* may be important for fibrin polymerization. That is why we could consider DT as molecular instrument used by *C. diphtheriae* at the site of colonization for the partial epithelial cell damage in order to get small portion of fibrinogen from the blood for the fibrin formation. After short bleeding, the production of DT is inhibiting by iron ions from incoming hemoglobin. DT also can get to the blood circulation via damaged epithelia and thus cause severe systemic toxic effects. Diphtheria toxin exerts its effects on distant tissues and organs, especially the heart (causing myocarditis), and the peripheral and cranial nerves (causing weakness progressing to paralysis), if absorbed from the site of infection.

Assessment of anti-diphtheria protection

Serologic methods of diphtheria diagnosis based on the detection of diphtheria toxin or on increased level of antitoxic antibodies. Therefore,

measurement of antitoxin level in diphtheria patients could provide important clinical information about course of infection.

In addition, determination of anti-toxin antibodies is essential for characterization of the immune status of population, and evaluation of the immunogenicity of diphtheria vaccines in clinical trials, as well as for monitoring long-term immunity and thus provides recommendations for vaccination policy. Data obtained from serological studies serve as an important guide in choosing of local strategy of vaccination. Detecting the existence of a cohort of susceptible subjects can predict the risks for disease outbreaks. Therefore, it is of critical importance to have methods for assessment of anti-diphtheria immunity that are accurate, reproducible, specific, and sensitive.

Most symptoms of diphtheria are resulted from the diphtheria toxin action; therefore, protection against disease depends on antibody level against the toxin (antitoxin). The assessment of the anti-diphtheria protection in healthy population is common for a surveillance system within any National Program of Immunization. According to the Order N 545 of Ministry of Health of Ukraine from 24.11.2003 “About Ukrainian population immunity against diphtheria and tetanus”, clinicists also need “to provide annual studies of population immunity to diphtheria and tetanus among healthy population (1.2.)”

Antitoxic antibodies probably play a main role in the immunity against diphtheria. Serum titers of antitoxin usually are expressed in International Units per milliliter (IU/ml) according to the diphtheria antitoxin standard. The cut-off of protective serum level of antitoxin is 0.01 IU per ml. (but it also depends on the method of titer determination). As believed, the powerful anti-toxin immunity (>1.0 IU/ml) can completely protects the body from infection caused by toxigenic strains. Although, the very little is known about protection associated with non-toxigenic strains.

Classical serological tests tend to underestimate low concentrations of diphtheria antibody. That is why antitoxin level under 0.1 IU per ml could not be defined precisely in many laboratories where hemagglutination test is used for this purposes. In clinical interpretation of results, antibody titers classified into one of the following categories: insufficient protection (<0.1 IU/ml), satisfactory protection (0.1–1.0 IU/ml) and high levels of protection (>1.0 IU/ml) [44]. However, with more reliable techniques it is possible to define an additional categories like short-term protection (0.01–0.1IU/ml) and no protection (<0.01 IU/ml).

Numerous *in vivo* and *in vitro* tests for the measuring of diphtheria antitoxin levels in serum have been standardized and implemented for laboratory practice. Among the *in vivo* protocols are the Schick test in humans and the classical toxin neutralization (TN) assay in rabbits or

guinea pigs. There is also the *in vitro* toxin neutralization test in microcell culture plates using highly sensitive Vero (green monkey renal epithelium) cell line [80]. Several *in vitro* serologic techniques for diphtheria antitoxin determination are described [81].

Toxin neutralization tests. DT is a toxic agent that can kill eukaryotic cells and can cause systemic reaction in sensitive organisms. Protective antibodies can block specific binding of DT to cell receptor and therefore to protect the cell and the body from toxic action of DT. Existing toxin neutralization tests exploit *in vivo* or *in vivo* models of toxicity for measuring the level of antitoxin by dose-dependent neutralization effect.

DT can cause *in vivo* inflammatory response when injected in small doses intracutaneously into the skin of humans or sensitive animals. The ability of specific antibodies to prevent this reaction can be utilized to determine the activity of antitoxin. Thus, the *in vivo* neutralization tests show the functional capacity of antibody to neutralize toxin in live organisms.

One of the first methods to estimate immunity against diphtheria in humans was intra-dermal Schick test with active diphtheria toxin [82]. Béla Schick designed this test in 1913 as an approach to determine susceptibility to diphtheria in children. This method allows controlling the population immunity against diphtheria. At that point, immunization was available for those who had never been naturally immunized by exposing to live diphtheria bacilli. This test eventually led to the eradication of the childhood disease, made Béla Schick world famous [83].

The Schick test involves injecting a very small amounts (0.1 ml of diluted 1/50 MLD for the guinea pigs) of the toxin into the skin of the forearm and evaluating the reaction at the injection site after 48 hours [84]. The result of positive test manifested in inflammatory reaction indicates susceptibility to diphtheria, whereas result of negative test without any reaction indicates immunity (antibody neutralizes toxin). A control injection with inactivated toxin had to be performed to exclude allergic reactions to toxin. Schick test results usually correlate well with serum antitoxin levels. The average antitoxin level up to 0.1-0.3 IU/mL is corresponded to the negative Schick test reaction when antibodies can completely neutralize injected toxin. However this test is no longer used in healthcare due to safety requirements, painful effect when results are positive, time-consuming, need for two visits, occurrence of pseudo negative reaction, etc. Currently, passive hemagglutination reaction with red blood cells is commonly used for this purpose.

There are several biological tests on sensitive animals are also available to quantify the level of antitoxin. The *in vivo* neutralization tests can be performed on rabbits (Jensen, 1933) or guinea-pigs (Glenny & Llewellyn-Jones, 1931). Different dilutions of serum mixed with fixed amounts of

diphtheria toxin can be injected into the depilated skin of the animal, and the antitoxin concentration could be estimated based on the presence or absence of an inflammatory reaction. The *in vivo* toxin neutralization test using guinea pigs or rabbits is referred as the “gold standard” method for determining protective levels of antitoxin in serum. The toxin neutralization assay has been recognized as an accurate and sensitive test able to detect antitoxin levels as low as 0.001 IU/mL [85]. However, this test requires large numbers of animals, relatively large volumes of serum as well as specialized facilities and personnel trained to work with animals. Therefore, this test is highly expensive and time-consuming, thus it is not convenient for practical use in serological diagnosis or epidemiological monitoring.

Consequently, *in vitro* methods as alternative to *in vivo* approaches can reduce time, costs and improve animal welfare. *In vitro* tests with cultured cells (neutralization test on microcell culture) have been developed as “humane” alternatives to the *in vivo* test for detection of diphtheria antitoxin [86]. The ability of diphtheria toxin to cause cell death in cultured mammalian cells used to determine diphtheria toxin or antitoxin amounts. This neutralization test based on the observation that the presence of antitoxin in serum samples can promote survival of sensitive mammalian cells in culture treated with DT in dose-dependent manner.

Vero cells [87] commonly used in neutralization tests *in vitro* are most sensitive to diphtheria toxin cells since they have largest numbers of receptors on their surface [88]. Results of *in vitro* neutralization test read as a change in color of the medium (from red to yellow) in the cell-culture plate wells after 3–4 days of incubation. Only alive cells can change the medium color due to the metabolic formation of acid, which changes the pH of medium. Treated with DT cells retain their ability to grow when serum samples contains antitoxin in sufficient amount [80].

The *in vitro* neutralization test in microcell culture is highly sensitive (minimum detectable level is 0.005 IU/mL) and provides comparable results to *in vivo* neutralization test on guinea pig and rabbit skin [89–91]. Thus, the Vero cell toxin neutralization assay is recommended by World Health Organization and European Pharmacopeia as *in vitro* alternative method for guinea pig assay for potency testing of vaccines [92, 93].

Alternatively, cell culture test without native DT use was proposed. In these test native DT replaced with recombinant fusion protein consisting of B-subunit of DT and enhanced green fluorescent protein (EGFP-SubB) (Fig. 3.). This protein was able to bind to DT receptor on Vero cells surface, but had no toxicity due to absence of C-domain [94]. This method based on the ability of anti-toxin antibodies to block the binding of fluorescently-labeled recombinant B subunit of DT to the cell surface receptor of Vero cells [95]. We called this method Vero-cell based toxin-binding in-

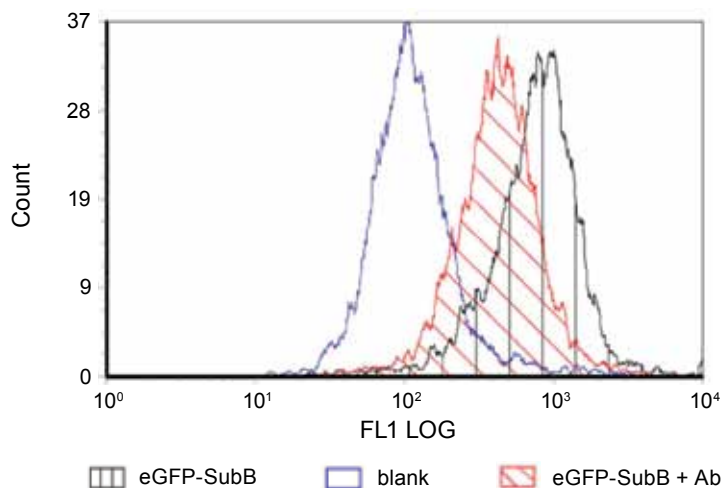


Fig. 3. The Vero-cell based toxin-binding inhibition test. This method is based on the ability of anti-toxin antibodies to block the binding of fluorescently-labeled recombinant B subunit of DT to the cell surface receptor. This process could be measured by flow-cytometry

hibition test (Vero-ToBI). Proposed *in vitro* method for quantitative evaluation of protective antibodies in sera is significantly rapid than existing tests and not require native DT.

Most important practical issues with all cell-culture tests are the relatively high complexity and time-consuming of the procedure, skilled staff and special laboratory equipment requirements. Therefore, a number of diagnostic laboratories may prefer to use more simplified format of diagnostic kits like serological assays.

Serological tests. For diagnostic and monitoring purposes, serological test can offer significant advantages in terms of cost, speed, ease of use and adaptability to automation. There are a number of serological methods for the estimation of antitoxin level available, like the passive hemagglutination assay [96] and the latex agglutination test [97], toxoid or toxin based ELISA, the double-antigen ELISA [98] and the double-antigen dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay [99], as well as the toxin binding inhibition assay [100] and multiplex assay [101] etc.

Currently, passive hemagglutination reaction (PHA) with red blood cells is still the most frequently used method in many laboratories for the detection of anti-toxin antibodies. The PHA test use coated with diphtheria toxoid sheep red blood cells for agglutination by diphtheria antitoxin [96, 102, 103]. Overall it is relatively simple and inexpensive method, but there is poor correlation of PHA with contemporary toxin neutralization

tests, which considered as standard reference methods. In addition, PHA test tends to underestimate low concentrations of antitoxin [104], lacks sensitivity and obviously needs improvement or replacement [81, 105]. Therefore, new assays for the detection of diphtheria antitoxin levels in the population extremely desirable.

An enzyme-linked immunosorbent assay can make the good alternative to PHA for the detection of anti-toxin antibodies. The indirect ELISA which is the simplest variant of this assay involves the estimation of antitoxin bounded to diphtheria toxin (or toxoid) adsorbed on ELISA plates [106]. The almost exact correlations between both the Toxoid-ELISA and the Toxin-ELISA were indicated [81]. Indirect ELISA tests in addition have the ability to measure class-specific antibodies such as IgG, IgM or IgA.

Results of the ELISA have high reliability and reproducibility. When the antibody titer is >0.1 IU/mL results of ELISA have good correlation with results of the neutralization tests in guinea-pigs [107] or in tissue culture [108], however there is poorer correlation with results of the neutralization test when the antibody titer is lower 0.1 IU/mL.

Better correlation can be achieved with modified ELISA tests [98, 100, 107] like the toxin binding inhibition test (ToBI-test) and the double-antigen ELISA, however potential drawback of these tests is inability to measure class-specific antibodies.

In the double antigen format of serologic tests one arm of the antibody binds to antigen immobilized on the plate and the other arm binds to labeled antigen providing enzymatic (DAE - double-antigen ELISA) [98] or fluorescent signal (DELFA - dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay) [99]. These assays showed a good correlation with established toxin neutralization assays. In addition, the double antigen system is indifferent for origin of serum permitting the use of calibration standard serum of animal origin to measure antitoxin levels in humans in international units (IU/ml). The detection limit for DELFA format with Eu^{3+} -labeled toxoids corresponded to 0.0003 IU/ml. This fast with a high capacity assays can be alternative to above mentioned methods in serological surveillance studies [99].

High sensitivity and specificity together with the highest correlation with the reference test has ToBI-ELISA. The toxin binding inhibition test (ToBI-test) based on inhibition of the binding of toxin to an antitoxin-coated immunoassay ELISA plate by free antitoxic antibodies [100]. Consequently, the ToBI-test resembles classical sandwich-ELISA combined with competition assay. Antitoxin titers as low as 0.002 IU/ml were detectable by the ToBI-test, is far below the level considered to be protective for human [100]. The ToBI-test shows good correlation ($r = 0.91-0.93$) with the

in vitro neutralization test on Vero cells [100]. From samples with a titer below 0.1 IU/ ml, as estimated by the reference test, 96% were correctly identified by the ToBI–ELISA [81]. Antibody affinity thought to be a key factor to influence the resulting relative antibody titer in ToBI-test [109].

Apparently, determination of antibody titer against the whole toxin molecule cannot provide information about the precise contents of protective antibodies. Protective properties are inherent mainly to the antibodies against B-subunit of the toxin, because only these antibodies can inhibit the toxin binding to the receptor. Antitoxic antibodies to A-subunit of DT often predominate over antibodies to B-subunit in children with diphtheria (as opposed to carriers and vaccinated children) (Fig. 4) [110]. Therefore, recombinant A- and B-subunits of DT [111] was proposed to use in ELISA and flow chromatography test-systems for diphtheria diagnosis and for monitoring of vaccine efficiency. Differential assessment of antibodies to distinct DT fragments with recombinant analogues of A and B subunits can be used for a rough evaluation of protective anti-diphtheria antibodies. In addition, the information regarding level of antibodies to A-fragment of DT provides indirect information about the contact of the person with DT during naturally occurred immunization process.

Recombinant soluble form of DT receptor sHB-EGF was proposed to use instead capture antibodies in sandwich ELISA for functionally active

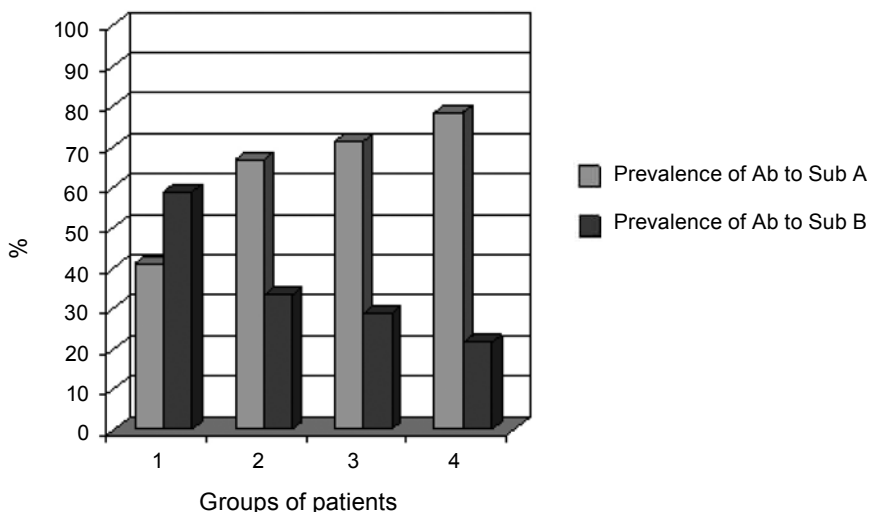


Fig. 4. The specificity of serum antibodies to separated subunits of diphtheria toxin. 1 – patients with diphtheria; 2 – carriers of toxigenic strains of *C. diphtheriae*; 3 – carriers of non-toxigenic strains of *C. diphtheriae* ; 4 – healthy volunteers immunized with DTP-vaccine

DT detection. Affinity constant for interaction of recombinant sHB-EGF with DT was similar to the affinity of natural sHB-EGF with DT. The developed sandwich ELISA allowed detection DT with sensitivity up to 1.9 ng/ml [112]. Another test-system for the detection of protective antibodies against DT was based on the competitive ligand-receptor enzyme immunoassay. Recombinant DT receptor sHB-EGF as the bottom layer (bait) and the enzyme-labeled toxin B-subunit as the second layer (prey) allowed identifying anti-toxin antibodies with protective properties (able to prevent the toxin-receptor interaction) (Fig. 5).

Developed methods for evaluation of protective anti-diphtheria immunity can be applied in clinics for monitoring the effectiveness of vaccination within the healthy population, as well as in search for new means of anti-diphtheria immunotherapy and immunoprophylaxis. (Fig. 6)

Immunity to diphtheria

Diphtheria toxin produced by *C. diphtheriae* during the disease or the carrier state has ability to induce production of naturally acquired antibodies against the toxin (antitoxin). Artificial immunity to diphtheria can be stimulated with diphtheria toxoid immunization. Antitoxin can pass through the placenta providing passive immunity to the infant during the

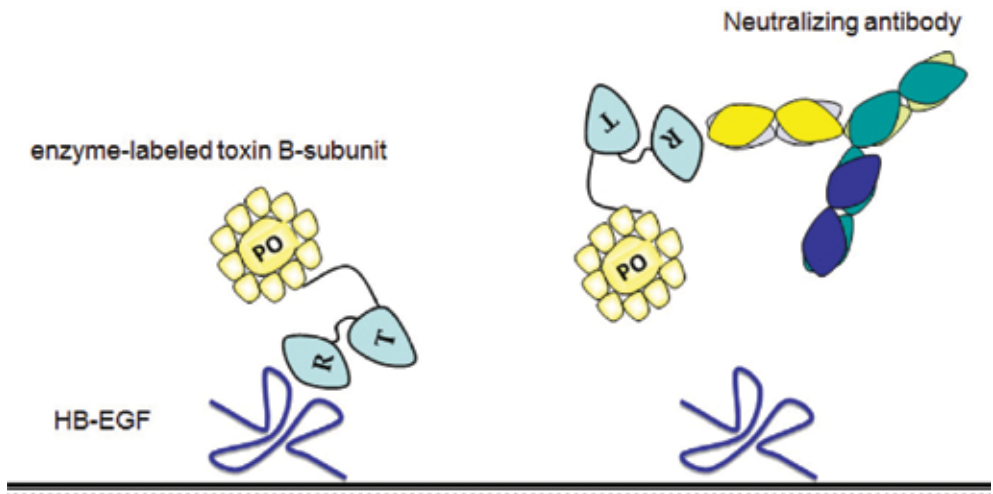


Fig. 5. The competitive ligand-receptor enzyme immunoassay for the detection of protective antibodies against DT. Application of recombinant DT receptor (HB-EGF) as the bottom layer (bait) and the enzyme-labeled toxin B-subunit as the second layer (prey) allows to identify anti-toxin antibodies with protective properties able to prevent the toxin-receptor interaction



Fig. 6. Kit for the detection of protective antibodies against DT based on the competitive ligand-receptor enzyme immunoassay

first months of life. Patients can acquire passive immunity to diphtheria by injection of equine antitoxin in course of the disease therapy.

As supposed, the primary role in the protection against diphtheria belongs to the antibodies of IgG class, but protection potential of IgA and IgM antibodies is remains underestimated. As mentioned earlier, antibodies to B-fragment of DT are more protective than antibodies to A-fragment.

Recovery from diphtheria is also associated with activity of phagocytes at site of infection. However, there is little known about cell-mediated immune responses to toxin or toxoid and other antigenic substances of *C. diphtheriae*.

Passive immunity to diphtheria. Passive immunity to diphtheria can occur naturally when maternal antibodies are transferred to the fetus through the placenta. Thus, most infants have protective antitoxin level acquired passively from their mothers [113]. However, the half-life of passively acquired by newborns antitoxin is about 30 days [114], thus level of these antibodies significantly decreases between 6 and 12 months. Mothers and their infants have highest diphtheria antitoxin titers (above 0.1 IU/ml) in areas with normal circulation of toxigenic *C. diphtheriae* in population [115].

High titers of maternal antibodies can interfere with serologic response of infants to diphtheria vaccination. The modifying effect of passively-ac-

quired maternal antibodies in young infants is strongest under the age of 4 weeks [116]. High titers of passively transferred antibodies may temporarily interfere with active immunization of infants [117, 118]. Maternal transferred antibodies may suppress responses to the first or second vaccination [119]. Thus in the countries where circulation of toxigenic *C. diphtheriae* is common the early immunization of infant is not so effective due to the presence of high level of maternal antitoxin. At the other hand, early immunization of these infants can deplete their passive immunity due to the absorbance of maternal antibodies by injected toxoid.

Equine diphtheria antitoxin and other antidotes. Passive immunity to diphtheria can be also induced artificially, when high levels of horse antibodies (DAT – diphtheria antitoxin) specific for toxin are transferred to non-immune individuals in order to prevent or cure disease [120]. DAT neutralizes circulating toxin and can prevent progression of the disease. However, DAT could not directly kill live microorganism colonizing mucous epithelia. Therefore, additional treatment with antibiotics required.

This antitoxin was first used in 1890s for prevention of the disease [121–123]; however, modern application of DAT involves only the diphtheria treatment, but not its prophylaxis [124]. Patients with diphtheria suspected have to be given antitoxin and antibiotics in adequate dosage and placed into isolation. The treatment with DAT has serious drawbacks resulted in serum sickness, an immune complex disease, thus a better treatment for diphtheria patients remains desirable [125].

Ways to reduce immunogenicity and allergenicity of therapeutic equine antibodies are to decrease their molecular mass, to modify their Fc fragment and/or to humanize them. Therefore, monoclonal human antibodies, humanized rabbit or mouse antibodies, recombinant single chain fragment variable (scFv) antibodies with molecular mass of 25-35 kDa and camel nanobodies with molecular mass of 15 kDa are now considered as perspective toxin-neutralizing agents [126].

Antibody gene cloning coupled with phage display technique seems to be a relatively fresh solution for the issue of developing better therapeutic means. Generated antitoxic murine and human scFv antibodies have high affinity constants to B-subunit of DT (up to 10^9 M⁻¹) and could neutralize toxin binding to its receptor [127, 128]. Therefore, recombinant scFv antibodies against DT can be utilized for developing new therapeutic reagents.

Another concept of diphtheria treatment is based on preventing diphtheria toxin binding to its cellular receptor pro-HB-EGF by the soluble form of HB-EGF. In order to minimize its side effects sHB-EGF lacking growth-factor activity proposed [129].

Natural acquired active immunity to diphtheria occurs when a person is exposed to a live pathogen, and develops a primary immune response,

which leads to immunological memory. When toxigenic *C. diphtheriae* commonly circulated in population natural immunity to diphtheria can be acquired with unapparent infection. Subsequently immunity rise rapidly in early childhood reflecting increasing exposure to diphtheria microorganisms. In the pre-vaccination era diphtheria was primarily an infection of children. At some developing countries at the age of 10-15 years almost all individuals had natural acquired immunity to diphtheria [130–132]. This pattern was observed in Europe and the United States in pre-vaccination era [133, 134] and in developing countries until nowadays.

Residual coetaneous diphtheria is considered as an ongoing source of natural immunity, but insufficient data are available regarding the current prevalence of skin infections [135, 136]. Furthermore, exposure to live *C. diphtheriae* can determine natural boosting of diphtheria immunity after vaccination. The low level of antitoxin among adults in developed countries may result from reduced exposure to live toxigenic microorganisms and thus reduced opportunity to acquire naturally immunity [15] (Schou et al., 1987; Simonsen et al., 1987; Simonsen, 1989). That is why the schoolchildren in developed countries sometime have low titers of antitoxin.. Thus, many authors emphasize the urgency of general revaccination against diphtheria of schoolchildren and adults [137-142].

Vaccines. Invention of toxoid in 1923 by Gaston Ramon provided safe and effective means for vaccination [143]. Formaldehyde treatment of DT eliminates its enzymatic activity and ability to bind to cell receptor, but retains its antigenic properties. In addition, formaldehyde treatment enhances immunogenicity of toxoid while preserving its structural integrity and ability to induce highly active toxin-neutralizing antibodies [144, 145]. Such treatment converts toxic DT to harmless toxoid, which is widely used for immunization against diphtheria. Diphtheria toxoid is still the basis of current anti-diphtheria vaccines. Diphtheria toxoid in vaccines presented most commonly alone or in combination with tetanus toxoid (TD or Td) and whole cell pertussis (DTwP) or acellular pertussis (DTaP) formulations. Addition of aluminum salts as adjuvant increases immunogenicity of this vaccine preparations. DTwP was licensed in 1949 and DTaP - in 1981. Other combined vaccine with diphtheria toxoid may include combination of DTP with poliomyelitis virus vaccine (tetra-component formulation) or with vaccines against *Haemophilus influenzae* type B and hepatitis B (penta-component formulation).

The dosage diphtheria toxoid is measured in flocculation (Lf) units. The Lf unit is used to control quality of produced diphtheria toxoid and to confirm antigenic purity and content of toxoid prior to use in vaccine formulations [146]. It can also be used for determination of antigen content in the final products. The 1st International Reference Reagent (IRR)

of Diphtheria Toxoid for Flocculation Test (DIFT) was established by the WHO in 1988. This reagent is essential for the standardization of assays used to calculate Lf units of toxoids.

Vaccines for children under 7 years of age usually contain 7.5–25 Lf of toxoid per dose while vaccines for schoolchildren and adults contain 2–3 Lf per dose [44]. Diphtheria vaccine for adults is typically prepared without pertussis component (Td).

Non-toxic mutants of diphtheria toxin are considered as possible alternatives to the formaldehyde treated toxoid. These mutants called CRMs (cross-reactive materials) are naturally nontoxic and do not require chemical inactivation. Most promising antigen among them is CRM197, which is an enzymatically inactive and nontoxic form of diphtheria toxin that contains a single amino acid substitution (G52E) in the enzymatic A subunit [147]. Currently CRM197 is used as the carrier protein in several licensed polysaccharide-protein conjugate vaccines, for example pneumococcal conjugate vaccine (Prennar, Synflorix etc.). However, it is considered as antigen for immunization against diphtheria [148]. In addition, new vaccines based on CRM197 and directed against diphtheria are also being developed [149, 150]

Instead of diphtheria toxoid and CRM197 for immunization against diphtheria non-toxic recombinant subunits of diphtheria toxin can be considered as potential antigens to elicit immune response to distinct parts of DT molecule. Preliminary immunization with DT B-subunit was able to protect sensitive to DT animals from toxin action [95]. Recombinant B subunit had great potential to elicit protective immune response in immunized organisms, which allow considering this antigen as prospective component for future vaccine development.

The current diphtheria vaccines are delivered by parenteral route. They can induce high level of antitoxin, mainly IgG, which prevent systemic spread of the toxin. IgG antibodies also may exert a local protective effect, probably through transudation at the mucosal surfaces at site of bacterial colonization. However, IgA antibodies play more important role in the protection of mucosal surfaces of the body from mucosal-associated pathogens like *C. diphtheriae*. Mucosal vaccines can induce an immune response that more closely resembles natural immunity. In animal models of immunization, the nasal route of toxoid or CRM197 administration appears to have the advantage of inducing IgA mucosal response, making it highly attractive for the delivery of vaccines [151, 152]. However, the immunity to diphtheria in human subjects usually estimated in IU by the formation of protective serum IgG or IgM levels of immunoglobulin, but there are no accepted criteria for evaluation of toxin-neutralizing activity of secretory

IgA response. This circumstance significantly slows down the progress in intranasal vaccine approval.

Vaccination schedules. The World Health Organization introduced Expanded Programme on Immunization (EPI) with the aim to make vaccination available to all children throughout the World [153, 154]. The WHO recommendation for primary immunization of infants includes administration of three doses of DTP vaccine at the age of 6, 10 and 14 weeks (WHO, 2006) [44]. Generally accepted, that after three DTP vaccinations almost all children can achieve antibody levels higher than 0.01 IU/mL [44, 155].

However, there is no universal schedule for immunization against diphtheria appropriate for each country. The choice of a right schedule depends on the epidemiological pattern of diphtheria in defined territory. In developing countries where the reservoir of *C. diphtheriae* remains large and natural immunity plays significant role in protection against the disease, the first priority of WHO is to ensure 90% coverage of infants with the primary series of three doses of DPT vaccine. In developed countries, primary immunization usually consists of 3 doses of DPT vaccine given at intervals of one month from 2nd or 3rd months of age, and boosted by a fourth dose given in the second year of life or later [44]. According to the Ukrainian schedule of immunization primary series of DPT vaccine was given at 3rd, 4th, and 5th months of age, and a booster dose was administered at 18 months of age [Order of the Ministry of Health of Ukraine № 595 from 16.09.2011 "On the procedure of vaccination in Ukraine and quality control and circulation of medical immunobiological preparations"].

Unfortunately, in developed countries antitoxin serum concentration in infants shows a dramatic decline after the primary series of vaccinations. For example, infants vaccinated against diphtheria at the ages of 3, 5 and 12 months according the Swedish vaccination schedule results in formation of protective antibody levels until at least 30 months of age. However, at 30 months only 48% have antibody level considered necessary for long-term protection (titers ≥ 0.1 IU/ml) [156]. The decline of the antibody titers indicates a necessity of further studies to establish the duration of protection.

In countries with high rates of infant vaccination, the cases of diphtheria during childhood significantly declined. On the other hand, this leads to disappearing of toxigenic strains of *C. diphtheriae* circulating in population, which results in declining of antibody levels with age. Populations with high rates of infant vaccination can acquire susceptibility to outbreaks of diphtheria among adults, because their post-vaccination immunity decreased without permanent contact with toxigenic strains. Therefore, WHO recommend for industrialized countries to include additional boosters of DTP vaccine to the primary series of infancy immunization in

order to compensate the loss of naturally acquired boosting. Various national immunization schedules propose two booster doses: one during the second year of life and a second before school entry. In addition, people living in non-endemic areas may require additional boosters every 10 years period to retain all-time protection. Typically, a booster dose administered any time stimulates strong antitoxin production with mean levels above 1.0 IU/mL [44, 142, 157].

The Ukrainian schedule of immunization offers quite a lot of booster doses: one at 18 months of age and a second at six years of age, then at 14, 18, 23, 28 years of age and additional boosters at about 10-year intervals to maintain life-long protection [Order of the Ministry of Health of Ukraine N 595 from 16.09.2011]. Serological monitoring of antitoxin titers in population can be helpful tool for improving current immunization schedule.

Epidemiology. Economic and cultural changes including improved sanitation and hygiene may change the epidemiologic patterns of diphtheria [158]. Today diphtheria evolves from children's disease into disease affecting predominantly adults, with severe respiratory forms of infection. Outbreaks of diphtheria can reemerge until population-wide immunity will be restored by naturally acquired immunization or by broad vaccination of adults [15].

Current vaccines are very effective in preventing from severe forms of infection and infection-caused death, but they are not so effective against mild diseases or asymptomatic carrier states. Their effectiveness in protection from infection is estimated only at 70%–90%. Diphtheria outbreaks still can occur among highly vaccinated populations [159, 160].

It is assumed that there is no exactly defined level of antitoxin that gives complete protection from infection, and same antitoxin titers may give diverse protection in different subjects. Thus, an antibody concentration from 0.01 to 0.1 IU/ml may be considered as basic protection, whereas a higher titer of antitoxin may be needed for complete protection. Asymptomatic diphtheria carriers show high antitoxin titers [161].

Human cases or carriers are the reservoir for this infection. In general, total immunization resulted in considerable reduction of diphtheria incidences. It also results in some changes in the immune profile of various age groups following reduction of circulation of toxigenic strains. It is believed, that circulating toxigenic strains can provide opportunities for natural boosting and maintenance of immunity to infection. Adults become more susceptible to diphtheria due to reduced opportunities to keep high immunity through subclinical infections. Protective antibody levels decreases with age, thus in some developed countries, less than 50% of adults could be immune to diphtheria. The age groups with the lowest level of diphtheria antibodies are 20-40 year old or older [15, 44]. A large pool

of susceptible persons creates an epidemic potential. In some countries, old persons are still immune to diphtheria, and this is probably due to natural immunity.

Numerous studies have indicated that immunization against diphtheria toxin does not protect from the challenge of non-toxigenic *C. diphtheriae* strains. In highly immunized populations, toxigenic strains virtually disappear, although non-toxigenic strains may continue to circulate [42]. Among them the emergence of invasive non-toxigenic clones of *C. diphtheriae* [41, 162] has been described, but role of this infection as a potential source for respiratory diphtheria remains unclear.

Lessons from the diphtheria epidemic in the Former Soviet Union.

Diphtheria was well controlled in the Soviet Union due to well-established childhood vaccination program initiated in the late 1950s. The huge recurrence of diphtheria at the former Soviet Union Countries was the first large-scale diphtheria epidemic in developed countries in vaccination era. Diphtheria incidence started to increase in those countries in the early 1980s, reached its first peak in 1983 to 1985 and its second peak in 1994 to 1995. Epidemic factors were a large population of susceptible adults and children due to decreased immunization coverage, terrible socioeconomic conditions and returning of the military forces from Afghanistan where diphtheria was endemic [163–165].

Due to the reappearance of the epidemic diphtheria in the Newly Independent States in 1990, the European Laboratory Working Group on Diphtheria was established in 1993 [166]. In 2006, diphtheria surveillance network has been expanded and become officially recognized by the European Commission as a dedicated surveillance network, called DIPNET, covering 25 European countries as members. One of the main goals of this network is the evaluation and standardization of laboratory methods for diagnosis of diphtheria, especially due to the fact that diphtheria has become a rare disease in the majority of the participating countries [167].

Conclusions and Future Directions

Diphtheria was a major cause of childhood mortality in the pre-vaccination era. Routine childhood vaccination virtually eliminated diphtheria in most of industrialized countries. But outbreaks of diphtheria still occur in nonimmunized and immunocompromised groups even in developed countries. Today it is clear that high immunization coverage, prompt diagnostics and rapid identification of close contacts are principal things in control of diphtheria outbreaks. Nevertheless deeper understanding of the molecular mechanisms of bacterial pathogenesis is still required for efficient struggle with the disease.

Diphtheria represents a unique model for the study of the host-microbe interaction due to phage-encoding mechanism of DT production. Most symptoms of diphtheria are resulted from the diphtheria toxin, which is a product of phage genome. Therefore, immunity against disease is antitoxin-mediated. It is believed that potent humoral immune response to DT can provide the full protection of the body against disease. Peculiarities of humoral immune response also determine current form of diphtheria infection and carrier state. However, it is still unclear how the antibodies to extracellular secreted protein can help to eliminate bacterial cells. At the other hand it is apparent that antitoxic immunity could not provide protection against nontoxigenic strains, which could represent the dormant source of pathogen for the possible outbreaks of the disease.

The major characterized virulence factor of *C. diphtheriae* diphtheria toxin helps bacteria to invade the host, cause disease and evade host defense mechanisms. Years of study of the structure and function of DT have made its one of the best characterized bacterial protein toxins. But the identification of other virulence factors are still needed for complete understanding of the full picture of bacterial pathogenesis, including bacterial adhesion to the cells and spreading through the body by invasive process, biofilm formation and fibrin polymerization, intracellular viability and deal host defense mechanisms. Several experimental systems are available to clarify the mechanisms underlying *C. diphtheriae* infections: *in vivo* tests on rabbits and guinea pigs and *in vitro* tests on sensitive cell lines. Other opportunities can provide genomic information and post-genomic comparative analysis of different isolates with different pathogenic potential.

There are many important questions have been raised by recent epidemic of diphtheria in the Newly Independent States of the former Soviet Union and current outbreaks of the disease. First, this epidemic emphasized the necessities for new rapid diagnostic kits and new vaccination surveillance system for prevention of the disease and reducing the risk of the disease among children and adults in future.

Determination of anti-toxin antibodies during vaccination is essential step for the characterization of the immune status of population and monitoring long-term immunity. Such information could provide advanced recommendations for vaccination policy and can predict the spread of future diphtheria epidemics. Accurate determination of anti-diphtheria toxin antibodies is essential to establish susceptible cohorts and to obtain reliable information on the immune status of a given person in population. Therefore, it is of critical importance to develop new serological methods for this purpose that will be fast and specific.

The further understanding of the host immune response to *C. diphtheriae* will suggest novel strategies for treatment and prevention of diphtheria, along with infections caused by nontoxicogenic *C. diphtheriae* strains.

References

1. *Murphy J. R.* Corynebacterium Diphtheriae. – 1996.
2. *Hadfield T. L. et al.* The pathology of diphtheria // *J. Infect. Dis.* – 2000. – **181**, Suppl 1. – P. S116–20.
3. *Mofredj A. et al.* [Cutaneous diphtheria] // *Rev. Med. Interne.* – 1994. – **15**(8). – P. 515–520.
4. *Vitek C. R.* Diphtheria // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2006. – **304**. – P. 71–94.
5. *von Graevenitz A.* The changing epidemiology of diphtheria in the past two centuries // *Ann. Ig.* – 2002. – **14**(1 Suppl 1). – P. 1–5.
6. *Kleinman L. C.* To end an epidemic. Lessons from the history of diphtheria // *N. Engl. J. Med.* – 1992. – **326**(11). – P. 773–777.
7. *Nekrassova L. S. et al.* Epidemic diphtheria in Ukraine, 1991-1997 // *J. Infect. Dis.* – 2000. – **181**, Suppl 1 – P. S35–40.
8. *Niyazmatov B. I. et al.* Diphtheria epidemic in the Republic of Uzbekistan, 1993-1996 // *J. Infect. Dis.* – 2000. – **181**, Suppl 1 – P. S104–9.
9. *Nakao H.* Molecular epidemiology of diphtheria re-emerged in Russia // *Nippon Saikingaku Zasshi.* – 2000. – **55**(1) – P. 55–67.
10. *Titov L. et al.* Genotypic and phenotypic characteristics of Corynebacterium diphtheriae strains isolated from patients in belarus during an epidemic period // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – **41**(3). – P. 1285–1288.
11. *Onishchenko G. G.* The epidemic situation in the Russian Federation and measures for its stabilization // *Probl. Tuberk. Bolezn. Legk.* – 2003. – N 11. – P. 4–9.
12. *Loboda T. V.* Diphtheria among adults in Ukraine // *Lik. Sprava.* – 1995. – N 9-12. – P. 150–153.
13. *Rey M., Patey O., Vincent-Ballereau F.* Diphtheria s European come back // *Euro Surveill.* – 1996. – **1**(2). – P. 14–16.
14. *Zakikhany K., Efstratiou A.* Diphtheria in Europe: current problems and new challenges // *Future Microbiol.* – **7**(5). – P. 595–607.
15. *Wagner K. S. et al.* Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000-2009 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2012. – **18**(2). – P. 217–225.
16. *Markina S. S., Maksimova N. M., Lazikova G. F.* Diphtheria morbidity in Russia today // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2005. – N 1. – P. 31–37.
17. *Adler N. R., Mahony A., Friedman N. D.* Diphtheria: forgotten, but not gone // *Intern. Med. J.* – **43**(2). – P. 206–210.
18. *McLeod J. W.* The types mitis, inrermidius and gravis of corynebacterium diphtheriae: A Review of Observations during the Past Ten Years // *Bacteriol. Rev.* – 1943. – **7**(1). – P. 1–41.

19. *Cerdeno-Tarraga A. M. et al.* The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129 // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – **31**(22). – P. 6516–6523.
20. *Sangal V. et al.* Draft genome sequence of *Corynebacterium diphtheriae* biovar *intermedius* NCTC 5011 // *J. Bacteriol.* – 2012. – **194**(17). – P. 4738.
21. *Trost E. et al.* Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia // *J. Bacteriol.* – 2012. – **194**(12). – P. 3199–3215.
22. *Bonnet J. M., Begg N. T.* Control of diphtheria: guidance for consultants in communicable disease control // World Health Organization. *Commun Dis Public Health.* – 1999. – **2**(4). – P. 242–249.
23. *Wagner K. S. et al.* Diphtheria in the United Kingdom, 1986–2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans* // *Epidemiol. Infect.* – 2010. **138**(11). – P. 1519–1530.
24. *Wagner K. S. et al.* Screening for *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* in patients with upper respiratory tract infections 2007–2008: a multicentre European study // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2011. – **17**(4). – P. 519–525.
25. *Kraeva L. A. et al.* [Etiologic role of *Corynebacterium non diphtheriae* in patients with different pathology] // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2007. – N 5. – P. 3–7.
26. *Elden S. et al.* Laboratory-confirmed case of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* // *Euro Surveill.* – 2007. – **12**(3). – P. E070329.3.
27. *Bonmarin I. et al.* Diphtheria: a zoonotic disease in France? // *Vaccine.* – 2009. – **27**(31). – P. 4196–4200.
28. *Diez-Aguilar M. et al.* Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – **32**(6). – P. 769–772.
29. *Bezirtzoglou E., Stavropoulou E.* Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora // *Anaerobe.* – **17**(6). – P. 369–374.
30. *Freeman V. J.* Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae* // *J. Bacteriol.* – 1951. – **61**(6). – P. 675–688.
31. *Freeman V. J., Morse I. U.* Further observations on the change to virulence of bacteriophage-infected a virulent strains of *Corynebacterium diphtheria* // *J. Bacteriol.* – 1952. – **63**(3). – P. 407–414.
32. *Bardsdale W. L., Pappenheimer A. M. Jr.* Phage-host relationships in nontoxigenic and toxigenic diphtheria bacilli // *J. Bacteriol.* – 1954. – **67**(2). – P. 220–232.
33. *Braun V., Killmann H.* Bacterial solutions to the iron-supply problem // *Trends Biochem. Sci.* – 1999. – **24**(3). – P. 104–109.
34. *Boyd J., Oza M. N., Murphy J. R.* Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria *tox* iron-dependent regulatory element (*dtxR*) from *Corynebacterium diphtheriae* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1990. – **87**(15). – P. 5968–5972.

35. *White A. et al.* Structure of the metal-ion-activated diphtheria toxin repressor/tox operator complex // *Nature*. – 1998. – **394**(6692). – P. 502–506.
36. *Kunkle C. A., Schmitt M. P.* Analysis of a DtxR-regulated iron transport and siderophore biosynthesis gene cluster in *Corynebacterium diphtheriae* // *J. Bacteriol.* – 2005. – **187**(2). – P. 422–433.
37. *Allen C. E., Schmitt M. P.* HtaA is an iron-regulated heme binding protein involved in the utilization of heme iron in *Corynebacterium diphtheriae* // *J. Bacteriol.* – 2009. – **191**(8). – P. 2638–2648.
38. *Zherebko N. N., Kopanitsa L. V., Romanyuk S. I., Kolibo D. V., Shirobokov V. P.* Sequences of tox-gene and regulatory dtxr-gene in the non-toxicogenic and toxicogenic strains of *C. diphtheriae* // *Zh. AMS of Ukraine*. – 2005. – **11**(3). – P. 592–600.
39. *De Zoysa A., Efstratiou A., Hawkey P. M.* Molecular characterization of diphtheria toxin repressor (dtxR) genes present in nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in the United Kingdom // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – **43**(1). – P. 223–228.
40. *Mel'nikov V. G. et al.* *Corynebacterium diphtheriae* nontoxicogenic strain carrying the gene of diphtheria toxin // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2004. – N 1. – P. 3–7.
41. *Reacher M. et al.* Nontoxicogenic *corynebacterium diphtheriae*: an emerging pathogen in England and Wales? // *Emerg. Infect. Dis.* – 2000. – **6**(6). – P. 640–645.
42. *Wilson A. P.* The return of *Corynebacterium diphtheriae*: the rise of nontoxicogenic strains // *J. Hosp. Infect.* – 1995. – **30** (Suppl.) – P. 306–312.
43. *Sabbadini P. S. et al.* Fibrinogen binds to nontoxicogenic and toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2010. – **105**(5). – P. 706–711.
44. *The immunological basis for immunization series : module 2: diphtheria - Update 2009.* – 2009. – P. 28.
45. *Demikhovskaia E. V.* Diphtheroids and nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* in the etiology of diphtheria // *Mikrobiol. Z.* – 1999. – **61**(4). – P. 81–89.
46. *Kanungo R. et al.* Diphtheria due to non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae*: a report of two cases // *Indian. J. Med. Microbiol.* – 2002. – **20**(1). – P. 50–52.
47. *Gubler J. et al.* An outbreak of nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infection: single bacterial clone causing invasive infection among Swiss drug users // *Clin. Infect. Dis.* – 1998. – **27**(5). – P. 1295–1298.
48. *Hirata Jr. R. et al.* Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2008. – **41**(11). – P. 986–991.
49. *Puliti M. et al.* Experimental model of infection with non-toxicogenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and development of septic arthritis // *J. Med. Microbiol.* – 2006. – **55**(Pt 2). – P. 229–235.

50. *Gomes D. L. et al.* Corynebacterium diphtheriae as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence // *J. Med. Microbiol.* – 2009. – **58**(Pt 11). – P. 1419–1427.
51. *Hirata R. et al.* Intracellular viability of toxigenic Corynebacterium diphtheriae strains in HEp-2 cells // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2002. – **215**(1). – P. 115–119.
52. *Yersin R. E.a.A.*, Contribution a l'etude de la diphtherie // *Ann. Inst. Pasteur.* – 1888. – **2**. – P. 629–661.
53. *Pappenheimer A. M., Jr., et al.* Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells // *J. Infect. Dis.* – 1982. – **145**(1). – P. 94–102.
54. *Yamaizumi M. et al.* One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell // *Cell.* – 1978. – **15**(1). – P. 245–250.
55. *Choe S. et al.* The crystal structure of diphtheria toxin // *Nature.* – 1992. – **357**(6375). – P. 216–222.
56. *Iwamoto R. et al.* Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity // *EMBO J.* – 1994. – **13**(10). – P. 2322–2330.
57. *Naglich J. G. et al.* Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor // *Cell.* – 1992. – **69**(6). – P. 1051–1061.
58. *Brooke J. S., Cha J. H., Eidels L.* Diphtheria toxin:receptor interaction: association, dissociation, and effect of pH // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – **248**(2). – P. 297–302.
59. *Davis-Fleischer K. M., Besner G. E.* Structure and function of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) // *Front Biosci.* – 1998. – **3**. – P. d288–99.
60. *Sandvig K., Olsnes S.* Diphtheria toxin-induced channels in Vero cells selective for monovalent cations // *J. Biol. Chem.* – 1988. – **263**(25). – P. 12352–12359.
61. *Collier R. J.* Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century // *Toxicon.* – 2001. – **39**(11). – P. 1793–803.
62. *Pappenheimer A. M., Jr. et al.* Occurrence of diphthamide in archaeobacteria. *J. Bacteriol.* – 1983. – **153**(3). – P. 1342–1347.
63. *Abdel-Fattah, W. et al.* Insights into diphthamide, key diphtheria toxin effector // *Toxins (Basel).* – **5**(5). – P. 958–968.
64. *Jorgensen R., Merrill A. R., Andersen G. R.* The life and death of translation elongation factor 2 // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – **34**(Pt 1). – P. 1–6.
65. *Phan L. D., Perentesis J. P., Bodley J. W.* Saccharomyces cerevisiae elongation factor 2. Mutagenesis of the histidine precursor of diphthamide yields a functional protein that is resistant to diphtheria toxin // *J. Biol. Chem.* – 1993. – **268**(12). – P. 8665–8668.
66. *Kharseeva G. G., Alutina E. L., Vasil'eva G. I.* Macrophage apoptosis as a mechanism of pathogenic effect of diphtheria infectious agent // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2012. – N 5. – P. 63–66.

67. *Saelinger C., Bonventre P. F., Imhoff J.* Interaction of toxin of *Corynebacterium diphtheriae* with phagocytes from susceptible and resistant species // *J. Infect. Dis.* – 1975. – **131**(4). – P. 431–438.
68. *Kolibo D. V. et al.* Effect of diphtheria toxin on the viability of phagocytes and B-lymphocytes in animals sensitive and insensitive to it // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2002. – **74**(2). – P. 30–36.
69. *Gaspar A. H., Ton-That H.* Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae* // *J. Bacteriol.* – 2006. – **188**(4). – P. 1526–1533.
70. *Ott L. et al.* Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells // *BMC Microbiol.* – 2010. – **10**. – P. 257.
71. *Ott L. et al.* *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells // *BMC Microbiol.* – 2010. – **10**. – P. 2.
72. *Kolodkina V., Denisevich T., Titov L.* Identification of *Corynebacterium diphtheriae* gene involved in adherence to epithelial cells // *Infect. Genet. Evol.* – 2011. – **11**(2). – P. 518–521.
73. *Sabbadini P. S. et al.* *Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells // *Microb. Pathog.* – **52**(3). – P. 165–176.
74. *Moreira Lde O. et al.* Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – **69**(10). – P. 5907–5913.
75. *Mattos-Guaraldi A. L., Duarte Formiga L. C., Pereira G. A.* Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae* // *Microbes Infect.* – 2000. – **2**(12). – P. 1507–1512.
76. *Bertuccini L., Baldassarri L., von Hunolstein C.* Internalization of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells // *Microb. Pathog.* – 2004. – **37**(3). – P. 111–118.
77. *dos Santos C. S. et al.* Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages // *Microbiol. Immunol.* – 2010. – **54**(1). – P. 1–10.
78. *Ott L. et al.* Induction of the NFkappa-B signal transduction pathway in response to *Corynebacterium diphtheriae* infection // *Microbiology.* – 2013. – **159**(Pt 1). – P. 126–135.
79. *Pappenheimer A. M. Jr., Gill D. M.* Diphtheria // *Science.* – 1973. – **182**(110). – P. 353–358.
80. *Quevillon M., Chagnon A.* Microtissue culture test for the titration of low concentrations of diphtheria antitoxin in minimal amounts of human sera // *Appl. Microbiol.* – 1973. – **25**(1). – P. 1–4.
81. *Walory J., Grzesiowski P., Hryniewicz W.* Comparison of four serological methods for the detection of diphtheria anti-toxin antibody // *J. Immunol. Methods.* – 2000. – **245**(1-2). – P. 55–65.
82. *Ward G.* THE SCHICK REACTION: A Clinical Test for the Determination of Susceptibility to Diphtheria // *Br. Med. J.* – 1921. – **1**(3156). – P. 928–930.

83. *Birch C. A.* The Schick test. Bela Schick (1877-1967) // Practitioner. – 1973. – **210**(260). – P. 843–844.
84. *Barile M. F., Kolb R. W., Pittman M.* United States standard diphtheria toxin for the Schick test and the erythema potency assay for the Schick test dose // Infect. Immun. – 1971. – **4**(3). – P. 295–306.
85. *Van Ramshorst J. D.* Titration of diphtheria and tetanus antitoxins in sera of low titre // Bull. World Health Organ. – 1971. – **45**(2). – P. 213–218.
86. *von Hunolstein C. et al.* European sero-epidemiology network: standardisation of the results of diphtheria antitoxin assays // Vaccine. – 2000. – **18**(28). – P. 3287–3296.
87. *Macfarlane D. E., Sommerville R. G.* VERO cells (*Cercopithecus aethiops* kidney) growth characteristics and viral susceptibility for use in diagnostic virology. (Brief report) // Arch. Gesamte Virusforsch. – 1969. – **27**(2). – P. 379–385.
88. *Middlebrook J. L., Dorland R. B., Leppla S. H.* Association of diphtheria toxin with Vero cells. Demonstration of a receptor // J. Biol. Chem. – 1978. – **253**(20). – P. 7325–7330.
89. *Miyamura K. et al.* Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. II. Comparison with the rabbit skin method and practical application for seroepidemiological studies // J. Biol. Stand. – 1974. – **2**(3). – P. 203–209.
90. *Miyamura K. et al.* Micro cell culture method for determination of diphtheria toxin and antitoxin titres using VERO cells. I. Studies on factors affecting the toxin and antitoxin titration // J. Biol. Stand. – 1974. – **2**(3). – P. 189–201.
91. *Kriz B. et al.* Determination of diphtheria antitoxin in guinea-pig sera by the Jensen and tissue-culture methods // J. Biol. Stand. – 1974. – **2**(4). – P. 289–295.
92. *Di Giovine P. et al.* External quality assessment for the determination of diphtheria antitoxin in human serum // Clin. Vaccine Immunol. – 2010. **17**(8). – P. 1282–1290.
93. *Gupta R. K., Siber G. R.* Use of in vitro Vero cell assay and ELISA in the United States potency test of vaccines containing adsorbed diphtheria and tetanus toxoids // Dev. Bio. Stand. – 1996. – **86**. – P. 207–215.
94. *Kaberniuk A. A. et al.* Fluorescent derivatives of diphtheria toxin subunit B and their interaction with Vero cells // Ukr. Biokhim. Zh. – 2009. – **81**(1). – P. 67–77.
95. *Kaberniuk A. A. et al.* Toxin-neutralizing properties of antibodies to diphtheria toxin recombinant subunits A and B and a new method of their estimation // Ukr. Biokhim. Zh. – 2009. – **81**(3). – P. 92–101.
96. *Backhausz R., Veres G., Veto I.* New method of passive hemagglutination for the determination of diphtheria antitoxins and anatoxins // Arch. Belg. Med. Soc. – 1959. – **17**. – P. 447–468.
97. *Jouja V.* Determination of antibodies to diphtheria and tetanus toxoid by latex agglutination technique // Folia Microbiol. (Praha). – 1965. – **10**(6). – P. 341–345.

98. Kristiansen M., Aggerbeck H., Heron I. Improved ELISA for determination of anti-diphtheria and/or anti-tetanus antitoxin antibodies in sera // APMIS. – 1997. – **105**(11). – P. 843–853.
99. Aggerbeck H., Norgaard-Pedersen B., Heron I. Simultaneous quantitation of diphtheria and tetanus antibodies by double antigen, time-resolved fluorescence immunoassay // J. Immunol. Methods. – 1996. – **190**(2). – P. 171–83.
100. Hendriksen C. F., van der Gun J. W., Kreeftenberg J. G. Combined estimation of tetanus and diphtheria antitoxin in human sera by the in vitro Toxin-Binding Inhibition (ToBI) test // J. Biol. Stand. – 1989. – **17**(2). – P. 191–200.
101. van Gageldonk P. G. et al. Improved specificity of a multiplex immunoassay for quantitation of anti-diphtheria toxin antibodies with the use of diphtheria toxoid // Clin. Vaccine Immunol. – **18**(7). – P. 1183–1186.
102. Boyden S. V. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera // J. Exp. Med. – 1951. – **93**(2). – P. 107–120.
103. Nyerges G. et al. A Method for the Rapid Determination of Diphtheria Antitoxin in Clinical Practice // Acta Paediatr. Acad. Sci. Hung. – 1963. – **4**. – P. 399–409.
104. Galazka A., Abgarowicz A. Determination of level of diphtheria and tetanus antibodies by the passive hemagglutination method // Przegl. Epidemiol. – 1967. – **21**(4). – P. 445–459.
105. Skogen V. et al. Detection of diphtheria antitoxin by four different methods // Clin. Microbiol. Infect. – 1999. – **5**(10). – P. 628–633.
106. Camargo M. E. et al. Immunoenzymatic assay of anti-diphtheric toxin antibodies in human serum // J. Clin. Microbiol. – 1984. – **20**(4). – P. 772–774.
107. Knight P. A., Tilleray J., Queminet J. Studies on the correlation of a range of immunoassays for diphtheria antitoxin with the guinea-pig intradermal test // Dev. Biol. Stand. – 1986. – **64**. – P. 25–32.
108. Melville-Smith M., Balfour A. Estimation of *Corynebacterium diphtheriae* antitoxin in human sera: a comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay with the toxin neutralisation test // J. Med. Microbiol. – 1988. – **25**(4). – P. 279–283.
109. Vandenberg J., van der Gun J. W., Hendriksen C. F. Evaluation of toxin neutralisation in test systems for diphtheria antibody assessment // Dev. Biol. Stand. – 1999. – **101**. – P. 105–111.
110. Romaniuk S. I. et al. Specificity of antibodies to diphtheria toxin subunits in children with various forms of diphtheria infections // Ukr. Biokhim. Zh., 2001. – **73**(6). – P. 73–76.
111. Кабернюк А. А., Олійник О. С., Редчук Т. А. та ін. Клонування генів рекомбінантних субодиниць дифтерійного токсину *Corynebacterium diphtheriae* та їх експресія в клітинах *Escherichia coli* // Доповіді Національної академії наук України. – 2008. – № 3. – С. 160–166.
112. Короткевич Н. В., Колибо Д. В., Лабинцев А. Ю. та ін. Отримання рекомбінантного аналога секреторної форми НВ-EGF людини та

- оцінка перспектив його застосування в біотехнології // Біотехнологія. – 2010. – 3(4). – С. 44–54.
113. *Celko A. et al.* Transplacental antibodies. Part II: Maternal antibodies against the toxins of *C. diphtheriae* and *C. tetani* // *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* – 1985. – 29(1). – P. 83–88.
 114. *Anderson E. L., Belshe R. B., Bartram J.* Differences in reactogenicity and antigenicity of acellular and standard pertussis vaccines combined with diphtheria and tetanus in infants // *J. Infect. Dis.* – 1988. – 157(4). – P. 731–737.
 115. *Allerdist H., Ehrengut W., Fofana Y.* Diphtheria immunity in Mali (mothers and their neonates and children under two years of age // *Tropenmed. Parasitol.* – 1981. – 32(4). – P. 274–275.
 116. *Halsey N., Galazka A.* The efficacy of DPT and oral poliomyelitis immunization schedules initiated from birth to 12 weeks of age // *Bull. World Health Organ.* – 1985. – 63(6). – P. 1151–1169.
 117. *Hardy-Fairbanks A. J. et al.* Immune Responses in Infants Whose Mothers Received Tdap Vaccine During Pregnancy // *Pediatr. Infect. Dis. J.*
 118. *Swamy G. K., Garcia-Putnam R.* Vaccine-preventable diseases in pregnancy // *Am. J. Perinatol.* – 2013. – 30(2). – P. 89–97.
 119. *Bjorkholm B. et al.* Influence of high titers of maternal antibody on the serologic response of infants to diphtheria vaccination at three, five and twelve months of age // *Pediatr. Infect. Dis. J.* – 1995. – 14(10). – P. 846–850.
 120. *Matokhina A. G., Kapustian V. A., Perelygina O. V.* Assessment of different regimens of diphtheria serotherapy // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2010. – N 1. – P. 81–84.
 121. *Behring E. V.* Untersuchungen über das Zustandekommen der Diphtherieimmunität bei Thieren // *Dtsch. Med. Wochenschr.* – 1890. – 16. – P. 1145–1148.
 122. *Behring E. V., Kitasato S.* Ueber das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und der Tetanusimmunität bei Thieren // *Dtsch. Med. Wochenschr.* – 1890. – 16. – p. 1113–1114.
 123. *Raju T. N.* Emil Adolf von Behring and serum therapy for diphtheria. *Acta Paediatr.* – 2006. – 95(3). – P. 258–259.
 124. *Wagner K. S. et al.* A review of the international issues surrounding the availability and demand for diphtheria antitoxin for therapeutic use // *Vaccine.* – 2009. – 28(1). – P. 14–20.
 125. *Ciok A. E.* Horses and the diphtheria antitoxin // *Acad. Med.* – 2000. – 75(4). – P. 396.
 126. *Romaniuk S. I., Kolibo D. B., Komisarenko S. V.* Perspectives of application of recombinant diphtheria toxin derivatives // *Bioorg. Khim.* – 38(6). – P. 639–652.
 127. *Oleinik E. S. et al.* Development of recombinant scFv-antibodies against diphtheria toxin using phage display system // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2007. 79(5). – P. 91–97.

128. *Oliinyk O. S. et al.* Construction of immune library of murine immunoglobulin genes and screening of single-chain Fv-antibodies specific to diphtheria toxin B subunit // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2009. – **81**(2). – P. 68–79.
129. *Cha J. H. et al.* Receptor-based antidote for diphtheria // *Infect. Immun.* – 2002. – **70**(5). – P. 2344–2350.
130. *Sadoh A. E., Oladokun R. E.* Re-emergence of diphtheria and pertussis: implications for Nigeria // *Vaccine.* – 2012. – **30**(50). – P. 7221–7228.
131. *Kriz B. et al.* Immunological surveys of diphtheric antitoxic antibodies in some African and Asian countries // *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* – 1980. – **24**(1). – P. 42–62.
132. *Wiysonge C. S. et al.* Individual and contextual factors associated with low childhood immunisation coverage in sub-Saharan Africa: a multilevel analysis // *PLoS One.* – **7**(5). – P. e37905.
133. *Park W. H., Zingher A.* Diphtheria Immunity-Natural, Active and Passive. Its Determination by the Schick Test // *Am. J. Public. Health (NY).* – 1916. **6**(5). – P. 431–445.
134. *Young C. C. et al.* Diphtheria Studies: I-The Significance of the Schick Test in the Adult // *Am. J. Public. Health Nations. Health.* – 1934. – **24**(8). – P. 835–849.
135. *Lowe C. F., Bernard K. A., Romney M. G.* Cutaneous diphtheria in the urban poor population of Vancouver, British Columbia, Canada: a 10-year review // *J. Clin. Microbiol.* – **49**(7). – P. 2664–2666.
136. *Cockcroft W. H., Boyko W. J., Allen D. E.* Cutaneous infections due to *Corynebacterium diphtheriae* // *Can. Med. Assoc. J.* – 1973. – **108**(3). – P. 329–331.
137. *Lewis L. S. et al.* Assessment of vaccination coverage among adults 30–49 years of age following a mass diphtheria vaccination campaign: Ukraine, April 1995 // *J. Infect. Dis.* – 2000. – **181**, Suppl 1. – P. S232–6.
138. *Gautret P., Wilder-Smith A.* Vaccination against tetanus, diphtheria, pertussis and poliomyelitis in adult travellers // *Travel Med. Infect. Dis.* – 2010. – **8**(3). – P. 155–160.
139. *Christenson B. et al.* Impact of a vaccination campaign on adult immunity to diphtheria // *Vaccine.* – 2000. – **19**(9–10). – P. 1133–1140.
140. *Broder K. R. et al.* Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) // *MMWR Recomm. Rep.* – 2006. – **55**(RR-3). – P. 1–34.
141. *Updated* recommendations for use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis (Tdap) vaccine in adults aged 65 years and older - Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – **61**(25). – P. 468–470.
142. *Cameron C. et al.* Diphtheria boosters for adults: balancing risks // *Travel Med. Infect. Dis.* – 2007. – **5**(1). – P. 35–39.

143. *Ebisawa I.* The encounter of Gaston Ramon (1886-1963) with formalin: a biographical study of a great scientist // *Kitasato Arch. Exp. Med.* – 1987. – **60**(3). – P. 55–70.
144. *Petre J. et al.* The reaction of bacterial toxins with formaldehyde and its use for antigen stabilization // *Dev. Biol. Stand.* – 1996. – **87**. – P. 125–134.
145. *Rittenberg M. B., Pinney C. T. Jr., Iglewski B. H.* Antigenic relationships on the diphtheria toxin molecule: antitoxin versus antitoxoid // *Infect. Immun.* – 1976. – **14**(1). – P. 122–128.
146. *Lyng J.* Quantitative estimation of diphtheria and tetanus toxoids. 4. Toxoids as international reference materials defining Lf-units for diphtheria and tetanus toxoids // *Biologicals.* – 1990. – **18**(1). – P. 11–17.
147. *Giannini G., Rappuoli R., Ratti G.* The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197 // *Nucleic Acids Res.* – 1984. – **12**(10). – P. 4063–4069.
148. *Gupta R. K. et al.* Differences in the immunogenicity of native and formalinized cross reacting material (CRM197) of diphtheria toxin in mice and guinea pigs and their implications on the development and control of diphtheria vaccine based on CRMs // *Vaccine.* – 1997. – **15**(12-13). – P. 1341–1343.
149. *McNeela E. A. et al.* Intranasal immunization with genetically detoxified diphtheria toxin induces T cell responses in humans: enhancement of Th2 responses and toxin-neutralizing antibodies by formulation with chitosan // *Vaccine.* – 2004. – **22**(8). – P. 909–914.
150. *Rydell N. et al.* Use of an oral diphtheria vaccine in human // *Vaccine.* – 2006. – **24**(33-34). – P. 5928–5930.
151. *Rydell N., Sjöholm I.* Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvant // *Vaccine.* – 2004. – **22**(9-10). – P. 1265–74.
152. *McNeela E. A. et al.* A mucosal vaccine against diphtheria: formulation of cross reacting material (CRM(197)) of diphtheria toxin with chitosan enhances local and systemic antibody and Th2 responses following nasal delivery // *Vaccine.* – 2000. – **19**(9-10). – P. 1188–1198.
153. *Basu R. N.* Expanded programme on immunization and primary health care // *J. Commun. Dis.* – 1982. – **14**(3). – P. 183–188.
154. *Henderson R. H.* The Expanded Programme on Immunization of the World Health Organization // *Rev. Infect. Dis.* – 1984. – **6**, Suppl 2. – P. S475–9.
155. *Stewart T. A. et al.* Antibodies to diphtheria, tetanus and pertussis in infants before and after immunization with DTP (Triple Antigen) vaccine // *J. Paediatr. Child. Health.* – 1996. – **32**(5). – P. 378–381.
156. *Lagergard T. et al.* Determination of neutralizing antibodies and specific immunoglobulin isotype levels in infants after vaccination against diphtheria // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1992. – **11**(4). – P. 341–345.
157. *Trollfors B. et al.* Diphtheria, tetanus and pertussis antibodies in 10-year-old children before and after a booster dose of three toxoids: implications for the timing of a booster dose // *Eur. J. Pediatr.* – 2006. – **165**(1). – P. 14–18.
158. *Thofern E.* The success of hygiene in the last 40 years // *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. B.* – 1989. – **187**(4-6). – P. 271–294.

159. *Ohuabunwo C. et al.* Respiratory diphtheria among highly vaccinated military trainees in Latvia: improved protection from DT compared with Td booster vaccination // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2005. – **37**(11-12). – P. 813–820.
160. *Krumina A. et al.* Diphtheria with polyneuropathy in a closed community despite receiving recent booster vaccination // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 2005. – **76**(11). – P. 1555–1557.
161. *Kostyukova N. N., Gukasyan L. A.* Pathogenesis of diphtheria carrier state from the immunological point of view // *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* – 1977. – **21**(4). – P. 454–459.
162. *Romney M. G. et al.* Emergence of an invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – **44**(5). – P. 1625–1629.
163. *Galazka A.* The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era // *J. Infect. Dis.* – 2000. – **181**, Suppl 1. – P. S2–9.
164. *Dittmann S. et al.* Successful control of epidemic diphtheria in the states of the Former Union of Soviet Socialist Republics: lessons learned // *J. Infect. Dis.* – 2000. – **181**, Suppl 1. – P. S10–22.
165. *Dittmann S.* Epidemic diphtheria in the Newly Independent States of the former USSR--situation and lessons learned // *Biologicals.* – 1997. – **25**(2). – P. 179–186.
166. *Efstratiou A., Roure C.* The European Laboratory Working Group on Diphtheria: A global microbiologic network // *J. Infect. Dis.* – 2000. – **181**, Suppl 1. – P. S146–51.
167. *Neal S. E., Efstratiou A.* International external quality assurance for laboratory diagnosis of diphtheria // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – **47**(12). – P. 4037–4042.

DEGRADATION OF ANTHROPOGENIC CONTAMINANTS BY HIGHER PLANTS

G. KVESITADZE

Georgian National Academy of Sciences

Elimination of contaminants from the environment by microorganisms of different taxonomic groups is an evolutionarily determined property, which has already been widely discussed. Until recently, plants still occupying above 40% of the world land, were considered as organisms having only a limited potential for contaminants conjugation and accumulation within cell organelles. An analysis of experimental data of the last two decades revealed the great ecological potential of plants. It has been exposed to: the deep degradation processes proceeding in higher plants and in the majority leading to complete detoxification of anthropogenic contaminants; the enzymes carrying out oxidation and conjugation processes; the ability of some plant varieties to accumulate huge amount of heavy metals and deposit them in cellular structures; formation of anthropogenic contaminants conjugates with endogenous compounds and enzymes participating in this process. Although, still there are uncertain questions closely related to the contaminants multistage degradation process in plants. Based on 40 years experience in this area the author is making an attempts for the evaluation of different aspects of plants ecological potential in the modern understanding; to assume mechanism of inter replacement of enzymes participating in oxidative degradation of organic contaminants in higher plants; to stress the importance of phenoloxidase, enzyme hitherto unknown to participate actively in remediation processes (contaminants oxidative decomposition); to reveal the criterion for the evaluation under the action of contaminants of such precise indicator of plant detoxification potential as deviations in ultra-structural level of plant cells.

Natural contaminations such as the emission of poisonous gases during a volcanic eruption and earthquakes, swamps poisoned evaporations, synthesis of toxic compounds by lower (microorganisms) and higher plants, etc., in comparison with the human contribution to the environmental contamination is much less impressive. As a result of urbanization, the unpredictable growth of industry and transport, production of chemicals for agriculture, military activities, etc., the concentration of anthropogenic toxicants spread in nature, especially in some regions exceeds all the permissible standards. In spite of difficulties in quantitative, as well as in qualitative estimation, and having a tendency to be increased, the amount of spread out contaminants exceeds annually one billion tons. Most dangerous among these contaminants are considered as emergent

because of their persistence, bioaccumulation, and toxicity along with our awareness of their prominent occurrence in the environment. In different ways, huge amounts of these hazardous substances or toxic intermediates of their incomplete transformations are accumulated in different niches of biosphere, significantly affecting ecological balance. Lately, many ecological technologies have been elaborated, targeted to minimize the flow of toxic compounds to the biosphere and to control their level or state [Tsao, 2003; Kvesitadze et al., 2006;]. Despite the definite positive effect from the realization of these technologies (physical, chemical, mechanical etc), the intensive flow of toxic compounds to the biosphere is still increasing.

Nevertheless, the plant kingdom assimilates toxic compounds, removing them from the environment, naturally providing long-term protection and monitoring against their environmental dispersal. Obviously, microorganisms and plants represent the main power of nature permanently straggling for the maintaining of ecological balance.

Plants being recently recognized as important ecological tool and in order to properly evaluate their detoxification potential; the following ecological specificities of these organisms should be emphasized:

- Higher plants simultaneously contact three main ecological niches: soil, water and air.

- Well-developed root system of higher plants determines soil-plant-microbial interaction, representing unique process, significantly affecting the overall plant metabolism.

- Large assimilating surface area of plant leaves (adaxial and abaxial), significantly exceeding in size the above ground surface under the plant, permits the absorption of contaminants in a big quantity from air via the cuticle and stomata.

- Unique internal transportation system in both directions, distributing all penetrated compounds throughout the entire plant.

- Autonomous synthesis of vitally important organics and extra energy during prolonged remediation process.

- Existence of enzymes catalysing oxidation, reduction, hydrolysis, conjugation and other reactions of multistage detoxification process.

- Large intracellular space to deposit heavy metals and conjugates of organic contaminants.

- Functionalization and further transformation of organic contaminants in plant cells (conjugation, deep oxidation, etc.).

The contaminants penetration into the roots essentially differs that into the leaves. Substances pass into roots only through cuticle-free unsubsided cell walls. Therefore, roots absorb substances much less selectively than leaves. Roots absorb environmental contaminants in two phases: in the first fast phase substances diffuse from the surrounding medium into

the root; in the second they gradually distribute and accumulate in the tissues. The intensity of the contaminants absorption process, characterized by various regulations, depends on contaminants solubility, molecular mass, concentration, polarity, pH, temperature, soil humidity, etc. [Kvesitadze et al., 2006, Korte et al., 2000].

Nowadays there are experimental data obviously demonstrating plants potential to activate a definite set of biochemical and physiological processes to resist the toxic action of contaminants by the following mechanisms:

- excretion;
- conjugation of contaminants with intracellular compounds and further compartmentalization of conjugates into cellular structures;
- decomposition of environmental contaminants to standard cell metabolites or their mineralization.

Commonly, plants gradually degrade organic contaminants, entering cells to avoid their toxic action. According to contaminants assimilating potential plants are differing up to four orders of magnitude that allowed classifying plants as strong, average and weak absorbers of different structure contaminants. For instance the most active assimilators uptake up to 10 mg of benzene per 1kg of fresh biomass per day, the assimilation potential of the weak absorbers is measured in hundredths of mg [Ugrekheldize et al., 1997].

The fate of entered plant cell contaminants depends on their chemical nature, external temperature, variety of plants and phase of vegetation, etc. The simplest pathway of organic contaminants, entering the plant cell, is excretion. The essence of excretion is that the toxicant molecule does not undergo chemical transformation, and being translocated through the apoplast, is excreted from the plant. This pathway of xenobiotic (contaminant) elimination is rather rare and takes place at high concentrations of highly mobile (phloem-mobile or ambi-mobile) xenobiotics.

In the great majority, contaminants which were absorbed and penetrated into plant cell undergo enzymatic transformations leading to the increase of their hydrophilicity-process simultaneously accompanied by a decrease of toxicity. Successive phases of contaminants initial transformations in accordance to Sandermann's green liver concept are presented below [Sandermann, 1994] (Fig. 1):

Functionalization is a process whereby a molecule of a hydrophobic organic xenobiotic acquires hydrophilic functional group (hydroxyl, carboxyl, amino, etc.) as a result of enzymatic oxidation, reduction, hydrolysis, etc. Due to the introduction of functional group the polarity and correspondingly reactivity of the toxicant molecule is enhanced. This promotes an increase of intermediates affinity for enzymes, catalysing further transformation.

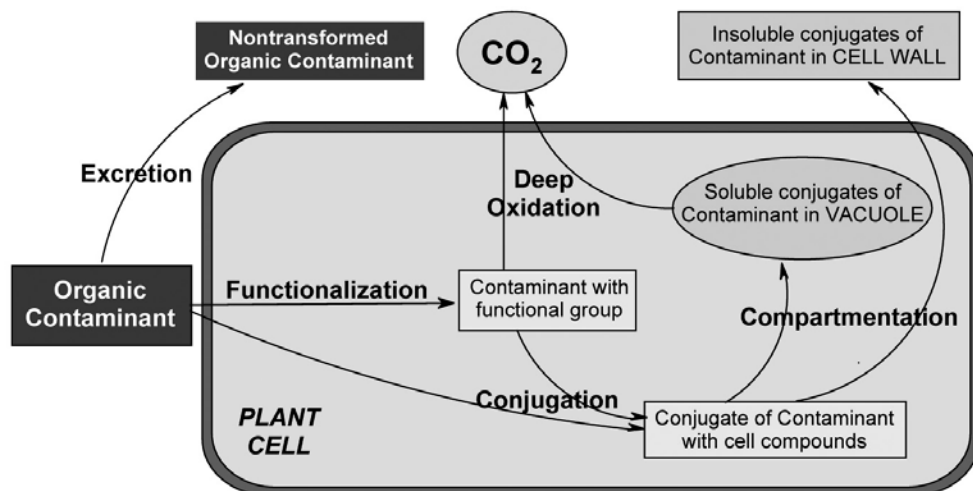


Fig. 1. The main pathways of organic contaminant transformation in plant cells

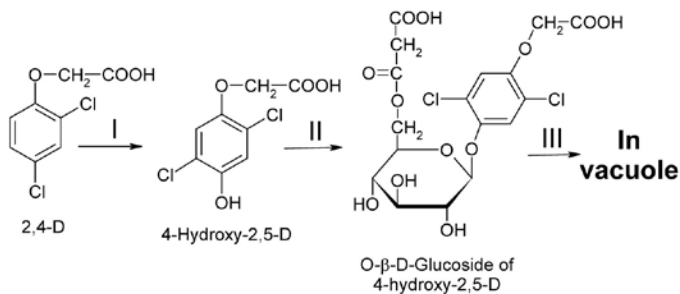
Conjugation takes place as a basic process in phytoremediation and consists in formation of chemically coupled contaminant to endogenous cell compounds (proteins, peptides, amino acids, organic acids, mono-, oligo-, polysaccharides, lignin, etc.) forming of peptide, ether, ester, thioether or other type covalent bonds. Intermediates of contaminants initial transformations or contaminants themselves possessing functional groups capable of reacting with intracellular endogenous compounds are susceptible to conjugation.

Commonly, immediately after penetration, the main part of the toxicant molecules undergoes conjugation and only a small amount is deeply degraded (0.1-5%, depending on contaminants structure). Conjugation is a wide spread defence mechanism in higher plants especially in cases when penetrated into plant cell concentration of the contaminants exceeds the plant's transformation (decomposition) potential. High amount of deep degradation to regular plant cell metabolites, or CO₂ and water is achieved in case of linear, low molecular structures of contaminants [Kvesitadze et al., 2006]. The toxicity of conjugates compared to parent compounds is decreased due to binding with non-toxic cellular compounds. Conjugates are kept in a cell for a certain period of time without causing visible pathological deviations in cell homeostasis. Conjugates formation also gives the plant cell extra time for the internal mobilization, induction of enzymes responsible for contaminants further transformation. Relatively quickly, after the termination of plant incubation with the contaminant, conjugates are no longer found in plant cells.

Some attempts have been made by the authors (unpublished data) to estimate different plant (soybean, ryegrass) cells potential to accumulate conjugated benzene in their cells in case of toxicant saturation. In spite of incomplete information it was suggested that for genetically non modified plants it could be, as a minimum, several molecules of contaminant conjugates per each plant cell. Although conjugation is one of the most widely distributed pathways of plant self-defence, it cannot be assumed as energetically and physiologically advantageous for the plant process. Firstly formation of conjugates leads to the depletion of vitally important cellular compounds, and secondly unlike deep degradation, formation of conjugates is maintaining contaminants basic molecular structure, and hence results only in partial and provisional decreasing of its toxicity.

Compartmentation is in most cases the final step of conjugates processing. Temporary (short or long) storage of conjugates in certain compartments of the plant cell takes place. Soluble conjugates of toxic compounds (coupled with peptides, sugars, amino acids etc.) are accumulated in cell structures (primarily in vacuoles), while insoluble conjugates (coupled with, lignin, starch, pectin, cellulose, xylan) are moved out of the cell via exocytose in the apoplast, being accumulated in cell wall [Sandermann, 1994]. The compartmentalization process is analogous to mammalian excretion, essentially removing toxic part from metabolic tissues. The major difference between detoxification in mammals and plants is that plants do not have a special excretion system for the removal of contaminants conjugates from the organism. Hence they use a mechanism of active transport for the removal of the toxic residues away from the vitally important sites of the cell (nuclei, mitochondria, plastids, etc.). This active transport is facilitated and controlled by the ATP-dependent glutathione pump [Martinova, 1993] and is known as "storage excretion" [Coleman, et al., 1997].

The described above pathway of toxic compound processing i.e., functionalization → conjugation → compartmentalization, is well illustrated by the processing of anthropogenic contaminants of different structures. One of such examples demonstrating the transformation of organochlorine pesticides is the hydroxylation of 2,4-D followed by conjugation with glucose and malonyl residues and deposition in vacuoles [Sandermann, 1987].



2,4-D transformation for deposition in vacuoles

The Enzymes. Anthropogenic organic toxicants decomposition processes are closely related to many aspects of higher plants cellular metabolism. In prolonged and multifunctional detoxification processes quite a few enzymes are actively involved. According to catalyzed reactions they are directly or indirectly participating in detoxification process.

Transformations of contaminants during functionalization, conjugation and compartmentation are of enzymes function. It is remarkable that due to their unusual flexibility in the absence of xenobiotics, in plant cell these enzymes catalyse reactions typical of regular plant cell metabolism. The enzymes directly participating in the transformation process of anthropogenic contaminants are presented below:

- Oxidases, catalyzing hydroxylation, dehydrogenation, demethylation and other oxidative reactions (cytochrome P450-containing monooxygenases, peroxidases, phenoloxidases, ascorbatoxidase, catalase, etc.).
- Reductases, catalyzing the reduction of nitro groups (nitroreductase).
- Dehalogenases, splitting atoms of halogens from halogenated and polyhalogenated xenobiotics.
- Esterases, hydrolyzing ester bonds in pesticides and other organic contaminants.

Conjugation reactions of contaminants in plant cells are catalyzed by transferases: glutathione S-transferase (GST), glucuronozyl-O-transferase, malonyl-O-transferase, glucosyl-O-transferase, etc. Compartmentation of intermediates of contaminants transformation-conjugates takes place under the action of ATP-binding cassette (ABC) transporters [Eckardt, 2001]. Depending on the structure of the contaminant, some other enzymes may also be involved in their degradation process.

Prolonged in time cellular decomposition of contaminants involves participation of enzymes providing plant cell with extra energy needed for the defence processes, induction of the enzymes, and provision of cells by vitally important secondary metabolites. Enzymes involved in these

and similar processes obviously indirectly participate in the detoxification of contaminants. The correlation between the penetration of organic contaminants (alkenes, aromatic hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons) in plant cells and the corresponding changes in the activities of enzymes participating in energy supply (malate dehydrogenase) and nitrogen metabolism (glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase) has been revealed. As it has been shown the activities of the enzymes are highly affected by xenobiotics concentration, exposure time and mode of illumination [Kvesitadze et al., 2001].

Ecologically the most advantageous pathway of organic contaminants transformation in plants is their deep oxidative degradation. In higher plants mainly the following enzymes are responsible for this process: cytochrome P450-containing monooxygenase, peroxidase and phenoloxidase. To correctly evaluate the universality of the action of these enzymes, responsible for the degradation of different structure organic contaminants, some of their specificities should be emphasized.

Cytochrome P450-containing monooxygenases (EC 1.14.14.1) are mixed-function enzymes located in the membranes of the endoplasmic reticulum (microsomes) [Robineau et al., 1998]. Monooxygenase system contains redox-chain for electron free transport, the initial stage of electron transfer is a NADPH-cytochrome P450 reductase (EC 1.6.2.4); the intermediate carrier—cytochrome b_5 , and the terminal acceptor of electrons—cytochrome P450. When NADPH is used as the only source of reductive equivalents, the existence of an additional carrier, a NADH-dependent flavoprotein is required. NADH may also be oxidized by the NADPH-dependent redox system. In the latter case cytochrome b_5 is not required. The cytochrome P450-containing monooxygenases use NADPH and/or NADH reductive equivalents for the activation of molecular oxygen and incorporation of one of its atom into lipophilic organic compounds (XH) that results in formation of hydroxylated products (XOH) [Schuler, 1996]. The second atom of oxygen is used for the formation of a water molecule (Fig. 2).

Plant cytochrome P450-containing monooxygenases play an important role in the hydroxylation of organic contaminants [Sandermann, 1994]. The enzymes participate in the reactions of C- and N-hydroxylation of aliphatic and aromatic compounds, N-, O-, and S-dealkylation, sulphoxidation, deamination, N-oxidation, oxidative and reductive dehalogenation, etc. [Schuler, 1996., Morant et al., 2003]. The resistance of plants against herbicides is mediated by their rapid intracellular transformation into hydroxylated products and subsequently conjugated to carbohydrate moieties in the plant cell wall. For example, N-demethylation and ring-methyl hydroxylation of the phenylurea herbicide chlorotoluron in wheat

Plants oxidative metalloenzymes

Enzyme	Physiological function	Existence in cell	Localization	Specificity to toxicants	Limiting factors	Stability
Cytochrome P450 containing monooxygenase	Participation in a number of intracellular synthesizing reactions	Small amount, inductive nature	Endoplasmic reticulum, cytosol	Very high affinity for non-polar toxicants	NADPH, NADH	Labile, inactivating during substrate oxidation
Peroxidase	Hormonal regulation, lignification, response to stress, removing of peroxides	Large amount, inductive nature	Cell wall, vacuoles, cytosol, tonoplasts, plastids, plasmalemma	Affinity for aliphatic compounds	Hydrogen peroxide or organic hydroperoxides	Stable
Phenoloxidase	Oxidative transformation of phenols, lignification, cell defence reactions	Large amount, present in latent form too, inductive nature	Chloroplasts, cell wall, cytosol, tonoplasts	Affinity for aromatic compounds	Endogenous phenols	Stable

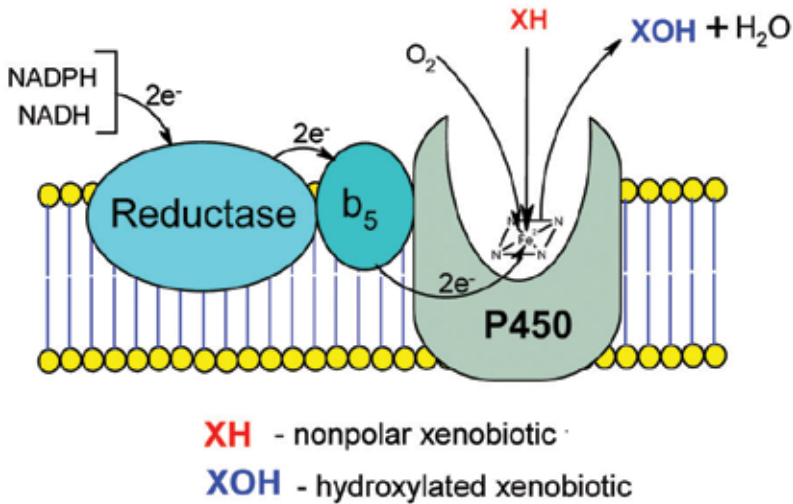
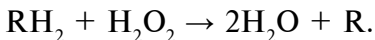


Fig. 2. Microsomal monooxygenase system

and maize is cytochrome P450-dependent processes [Fonee – Pfister, Kreuz, 1990., Mougin et al., 1990]. For some phenylurea herbicides in the Jerusalem artichoke cytochrome P450-mediated N-demethylation is sufficient to cause significant or complete loss of phytotoxicity [Didierjean et al., 2002].

Peroxidase. In higher plants, peroxidase activity increases in response to stress. The protection of cells from oxidative reactions imposed of all photosynthetic plants is one of the major functions of this enzyme. The great catalytic versatility of the peroxidase is its predominant characteristic, and, therefore, no single role exists for this multifunctional enzyme.

The peroxidase is defined by the following reaction:



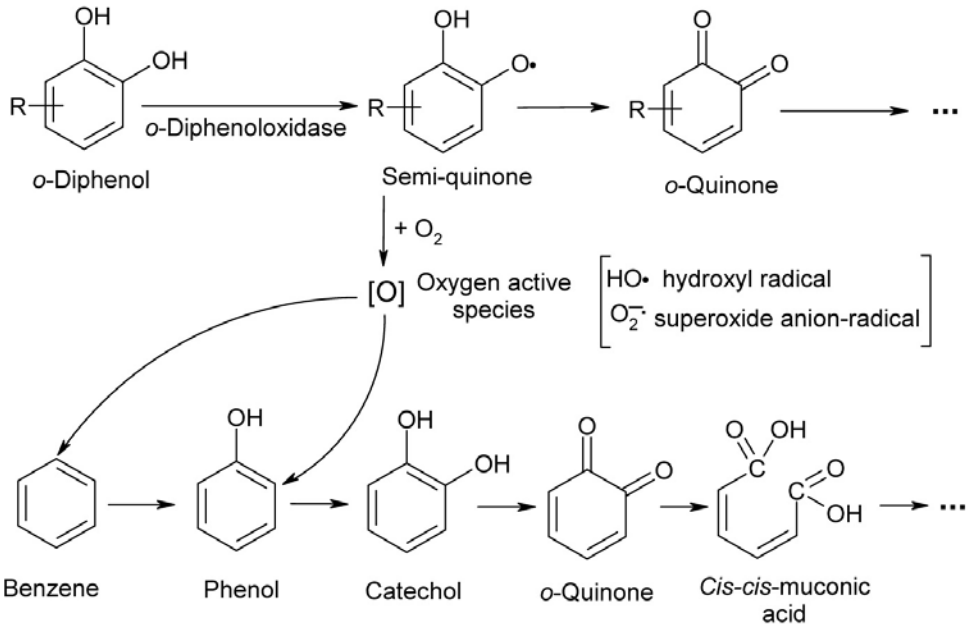
The peroxidases catalyze a number of free radical reactions. Alternatively, the compound that is directly oxidized by the enzyme further oxidizes other organic compounds, including xenobiotics. This notion is based on the wide ubiquitous distribution of this enzyme in plants (the isozymes of peroxidase in green plants occur in the cell walls, plasmalemma, tonoplasts, intracellular membranes of endoplasmic reticulum, plastids and cytoplasm), and the high affinity and wide substrate specificity of plants peroxidases to organic xenobiotics of different chemical structures. The participation of plant peroxidases in hydroxylation reactions of xenobiotics has been widely discussed in literature. For example, peroxidases from different plants are capable of oxidizing N,N-dimethylaniline [Shinohara

et al., 1984], 3,4-benzpyrene, 4-nitro-*o*-phenyldiamine [Wilson et al., 1994], 4-chloroaniline [Laurent, 1994], phenol, aminoflourene, acetaminophen, diethylstilbestrol, butylated hydroxytoluene, hydroxyanisoles, benzidine, etc. [Sandermann, 1994]; horseradish (*Armoracia rusticana*) peroxidase oxidizes tritium-labelled [C^3H_3] TNT [Adamia et al., 2006].

Phenoloxidases, a group of the copper-containing enzymes (other names-tyrosinase, monophenol monooxygenase, phenolase, monophenol oxidase, etc.) spread within the plant cell organelles catalyzing both monooxygenase and oxygenase reactions: the *o*-hydroxylation of monophenols (monophenolase reaction) and the oxidation of *o*-diphenols to *o*-quinones (diphenolase reaction). Currently accepted enzyme nomenclature classifies hydroxylating phenol oxidase as monophenol monooxygenase (EC 1.14.18.1) and *o*-diphenols oxidizing phenol oxidase as catechol oxidase (EC 1.10.3.1). Plant phenol oxidases appear to be a group of specific enzymes, oxidizing a wide range of *o*-diphenols, such as DOPA (dihydroxyphenylalanine), catechol, etc, but unable to convert *m*- or *p*-diphenols to the corresponding quinones, Substrate specificity of catechol oxidase from *Lucopus europaeus* and characterization of the bioproducts of enzymatic caffeic acid oxidation are presented in, FEBS Letters, 445, 103-110). The active center of phenol oxidases contains two copper atoms and exists in three states: “met”, “deoxy” and “oxy”.

Phenoloxidases actively participate in the oxidation of xenobiotics of aromatic structure. As it has been demonstrated, phenoloxidase from spinach, analogously to many other plants, oxidizes aromatic xenobiotics (benzene, toluene), by their hydroxylation and further oxidation to quinone [Ugrekheldze et al., 1997]. In a number of the cases, if the xenobiotic is not a substrate for the phenoloxidase, it may undergo co-oxidation in the following manner: the enzyme oxidizes the corresponding endogenous phenol by forming quinones or semi-quinones or both, i.e. compounds with a high redox potential. These compounds activate molecular oxygen by forming oxygen radicals, such as superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($\cdot OH$) [Cuillen et al., 1997., 2000], that gives compounds the capacity for the further oxidation of xenobiotic. The formation of these radicals enables phenoloxidase to participate in contaminants degradation processes also by co-oxidation mechanism presented below (Page 415).

Analogously, nitrobenzene is oxidized to *m*-nitrophenol, and the methyl group of [C^3H_3] TNT [Adamia et al., 2006] is oxidized by phenoloxidase from tea plant. The information which confirms this enzyme participation in the oxidative degradation of xenobiotics in higher plants is sparse [Ugrekheldze et al., 1997], despite the fact that participation of phenoloxidase should definitely be expected under xenobiotics degradation. Laccase of basidial fungi, analogous to higher plant phenoloxidase, have been better



*Enzymatic oxidation of *o*-diphenols (upper) by phenoloxidase and non-enzymatic co-oxidation of benzene (lower)*

explored. Laccase degrades different aliphatic and aromatic hydrocarbons [Colombo et al., 1996], and actively participates in the enzymatic oxidation of alkenes [Niku – Paalova, Viikari, 2000]. Crude preparations of laccase isolated from the white rot fungus *Trametes versicolor* oxidizes 3,4-benzopyrene, anthracene, chrysene, phenanthrene, acenaphthene and some other PAHs [Collins, Dobson, 1997]. The intensity of oxidation of these antropogenic contaminants is increased in the presence of such mediators as: phenol, aniline, 4-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzyl alcohol, methionine, cysteine, reduced glutathione, and others compounds-substrates of laccase [Johannes, Majcerczyk, 2000]. These data indicate that in the cases of fungal laccase and plant *o*-diphenoloxidase, the oxidation of hydrocarbons is carried out by a co-oxidation mechanism [Ugrekheldidze et al., 1997].

Apparently metallo-enzymes differing in their localization in plant cell organelles, structural organization, action mechanisms, substrate specificity, firstly, allow plants to oxidise wide spectrum of organic contaminants including aromatic structures containing contaminants and, secondly, regulate inter-replacement of these enzymes during contaminants (xenobiotics) oxidative degradation caused due to inability or decreased potential of

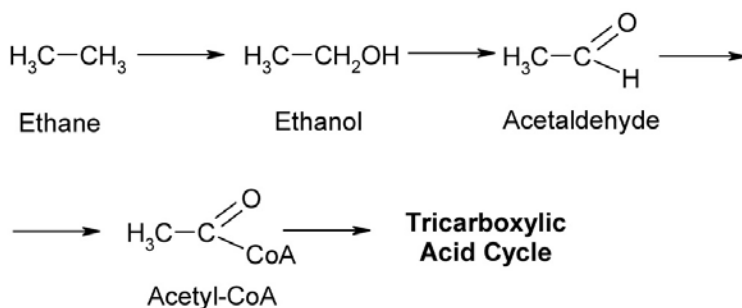
any of these enzymes to carry out further oxidation of structurally unsuitable intermediates.

Deep degradation of organic xenobiotics (contaminants) is multistage, mainly oxidative enzymatic process and only insignificant amount of toxic molecules undergo direct degradation, the majority of contaminants, conjugated with endogenous metabolites (above 80%), are accumulated in vacuoles and apoplasts and their further transformation takes place with some delay. The emission of $^{14}\text{CO}_2$ (up to 5% in case of labelled linear contaminants) indicates that the formation of conjugates and their compartmentalization in plant cells is followed by deep oxidation of the toxic parts of their molecules [Ugrekhelidze et al., 1997, Chrikishvili et al 2005].

Based on the number of experimental data it is supposed that the most rate-limiting stage of the whole process of xenobiotics transformation seems to be the initial hydroxylation of nonpolar contaminants. As a result of functional group introduction the molecule of transformed contaminants becomes easily accessible for further enzymatic transformation.

The transformation of the small molecular weight aliphatic xenobiotics as methane in tea plant (*Thea sinensis*) proceeds by the formation of fumaric acid. Transformation of ethane, propane and pentane leads to the formation of low molecular mass compounds largely composed by di- and tricarbon organic acids. Labelled fumaric, succinic, malonic, citric and lactic acids are identified in plant leaves exposed to these low molecular mass alkanes, with most of the radioactivity incorporated into succinic and fumaric acids. The absence of oxalic acid directly indicates that ethane in plants is oxidized monoterminally. The oxidation of ethane at one terminal carbon atom leads to the formation of acetyl-CoA, which in turn participates in the Krebs cycle [Durmischidze, Ugrekhelidze, 1979].

Long chain alkanes are subjected to similar transformations. For instance, after 40 min of incubation of leek leaves with emulsion of exo-

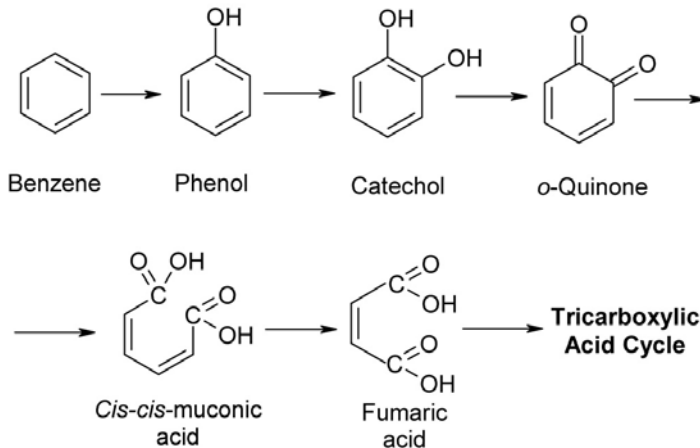


Transformation of ethane in higher plants

genous [^{14}C] octadecane in water, 9.6% of the total label is detected in esters, 6.4% in alcohols, and 4% in organic acids [Cassagne, Lessire, 1975].

The most significant input in understanding in plants detoxification process has been revealed by the discovery of plants ability to transform (oxidatively decompose) benzene and phenol via aromatic ring cleavage. As a result of such degradation carbon atoms of contaminants are incorporated into organic acids and amino acids. Similar data were reported for nitrobenzene, aniline, toluene, α -naphthol, and benzidine transformation in plants [Durmischidze et al., 1974a, b, Mithaishvili et al., 2005]. Oxidation of benzene and phenol by crude enzyme extracts of plants forms muconic acid as a result of ring cleavage, with catechol formation, as intermediate.

Further oxidation of muconic acid results in formation of fumaric acid. Labelled muconic and fumaric acids are found in plants exposed to



Oxidative degradation of benzene in plant cells

labelled benzene or phenol. Cleavage of the aromatic ring in endogenous substrates proceeds by the transformation of 3,4-dihydroxybenzoic acid into 3-carboxymuconic acid [Tateoka, 1970]. Phenoxyalkyl-carboxyl acids containing four and more carbon atoms in their side chain often undergo β -oxidation in plants. For instance, 2,4-dichlorophenoxybutyric acid is oxidized resulting by formation of 2,4-D [Hawf, Behrens, 1974, McComb, McComd, 1978, Taylor, Wain, 1978].

Finally contaminants degradation proceeds to standard cell metabolites or mineralization. Degrading xenobiotic the plant cell not only avoids its toxic action but also utilizes its carbon, nitrogen, and other atoms for

intracellular biosynthetic and energetic needs. The totality of such transformations is the essence of the plants detoxification process. Direct complete xenobiotic degradation in a plant cell is however accomplished only at low, metabolic, concentrations of environmental contaminants and respective time (it may last days or weeks).

Ultrastructure. To evaluate the ecological potential of plants, the data proving the responses at the level of cell ultrastructure under the action of contaminants, as the most precise indications of plants exploitation, should also be emphasized. Undoubtedly, penetration even a small concentrations of contaminants into plant cells leads to invisible, but most often measurable deviations in cell metabolic processes such as: induction of enzymes, inhibition of some intracellular metabolic processes, change the level in regular secondary metabolites, etc. The existence in plant cell contaminants in increased concentrations provokes clearly noticeable deviations in cells ultrastructural organization. It has been shown that the complex of changes and alterations in the main metabolic processes of plant cell elicited by organic pollutants (pesticides, hydrocarbons, phenols, aromatic amines, etc.) are connected with the deviations of cell ultrastructural architecture. The sequence and deepness of the destruction in plant cell organelles are determined by the variety of plant, chemical nature, concentration and duration of the contaminant action, etc. [Buadze et al., 1998, Zaalishvili et al., 2000]. This course of events has been experimentally demonstrated in a number of various higher plants exposed to different ^{14}C -labelled toxic compounds. In these experiments due to the penetration, movement and localization of contaminants in plant cells changes in ultrastructural organization has been shown. Apparently, the negative affects of toxic compounds on cell ultrastructure, depending on its concentration, could be divided on two types, being different for each contaminant and plant:

- metabolic, which is digested by the plant in spite of insignificant negative effect by the mobilization of plants internal potential
- lethal, leading to indigestible deviations and to the plant death.

Maize root apex cells exposed to ^{14}C -nitrobenzene action, its penetration across the plasmalemma and localization in subcellular organelles an shown on the Figure 3. Studies of penetration of ^{14}C -labelled xenobiotics into the plant cell indicate that labelled compounds at the early stages of exposure (5–10 min) are detected in the cell membrane, in the nuclei and nucleolus (in small amounts), and, seldom, in the cytoplasm and mitochondria. As a result of prolonged exposure the amount of a label significantly increases in the nucleus, at the membranes of organelles, in tonoplasts, and further in vacuoles, i.e. xenobiotic becomes distributed in

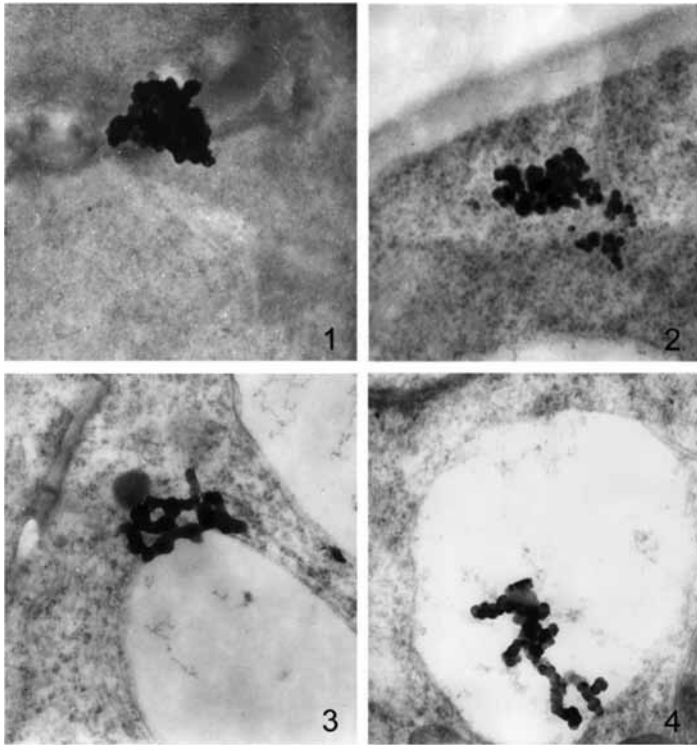


Fig. 3. Electron micrographs showing the penetration and movement of ^{14}C -labelled nitrobenzene (0.15 mM) in a maize root apex cell. The xenobiotic penetrated through the plasmalemma (1), moved to the cytoplasm (2), and thereafter translocated into vacuoles (3, 4): 1 – $\times 48\ 000$; 2 – $\times 36\ 000$; 3 – $\times 50\ 000$; 4 – $\times 30\ 000$

most of subcellular organelles, but ultimately there is a tendency of contaminants primary accumulation in vacuoles.

The general picture of the evolving action of organic contaminants on plant cells with duration of exposure is the following:

– Initially, changes in the configuration of the nucleus become noticeable. Simultaneously inhibition of DNA synthesis takes place. The barrier function of the plasmalemma and its ability to accumulate calcium are damaged. Ca^{2+} concentration in the cytoplasm is increased; Ca^{2+} -ATPase activity is inhibited. Mitochondria with swollen cristae and packed matrix become noticeable, the plastids are electron-dense and enlarged.

– Prolonged action of contaminants leads to a widening of the cisternae of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, vacuolization of the cytoplasm. The size of cytoplasm is thereby decreased and the periplasmic space concomitantly enlarged. In some cortical cells of the root apices, the number of ribosomes in the hyaloplasm is increased, and the

formation of polysomes is observed. Lysis of mitochondria and depletion of ribosomes from the endoplasmic reticulum of membranes take place. Multiple contacts between the endoplasmic reticulum and the plasmalemma, vacuoles, nucleus, and membranes of the mitochondria are detectable. The enhancement of the size of the nucleus and chromatin coagulation, indicating a disturbance of the DNA synthesis process, is observed. Nuclei acquire deviant shapes because of the development of many protuberances of the nuclear membrane. In leaf cells, chloroplast shape and composition become ill defined, the external membrane is not visible, the orientation of the system is disturbed, and matrix is brightened with large osmiophilic inclusions. In the cytoplasm accumulation of the differentiated cells of the root caps that secrete mucus, is visible. Some of these hypertrophied vesicles are fused forming a large deposit of mucus. Inhibition of the process of maturing secretory vesicles translocation towards the cell periphery is often correlated not only with the swelling of vesicles, but also with the disappearance of the normal dictyosomes.

Prolonged exposure to environmental contaminants causes the extensive destruction of cells and plant death.

Obviously plants, as remediators, the most effectively act at low and shallow contamination of soil and air for a long time, when no significant changes in cell ultrastructure might be detected. Nevertheless, it should be emphasized that plants subjected to high concentrations for relatively short periods in most cases are able to recover from slight deviations in cell ultrastructure and thus maintain their vital activities.

Phytoremediation is a unique cleanup strategy. The realization of phytoremediation technologies implies the planting on a contaminated area with one or more specific, previously selected plant species with the potential to extract contaminants from soil. A precise survey of the vegetation *on site* should be undertaken to determine what species of plants would have the best growth at the contaminated site. Based on the number of experimental results including the use of labeled xenobiotics and electron microscopic observations, the deep degradation of anthropogenic contaminants in higher plants could be considered as narrow but permanently working pathway having much less potential than conjugates formation process (especially in case of contaminants saturation).

During the last decade phytoremediation by conceptual methodology has become ecologically important commercial technology for decontamination of the environment. The successful realization of phytoremediation technologies greatly depends on the synergetic action of microorganisms and plants. In order to increase the ecological potential of plants, definite progress has already been achieved by the cloning of genes of the enzymes participating in contaminants transformation/accumulation. A number of

genetically modified plants having especially high accumulation potential and, correspondingly, large intracellular volume to deposit metabolite – xenobiotic conjugates have been created. Some publications [Lu et al., 1997, Song et al., 2003] are devoted to the discussion of these and other problems concerning the uptake of inorganic contaminants. In these publications where transgenic plants, characterized by enhanced tolerance to cadmium and lead (70-75 mM), which inevitably points to their hyperaccumulation potential, are described. Data indicate the doubling of the lead content in transgenic plants has also been detected [Peuke et al., 2004].

Among the large diversity of plants with perspectives for phytoremediation the poplar family attracts special interest. Owing to its strong root system it is characterized by the increased absorption ability. Multiple gene-engineering modifications of this plant have presented convincing evidence for the expediency in practical usage of some plants-transformants generated. Cloning of Glutathione S-transferase was successful in creation of several perspective transgenic clones. The transfer of cytochrome P450 genes to different plants has been a wide spread activity for the last decade [Ohkawa et al., 1999]. Some of the created transgenic plants are generally characterized by high resistance to herbicides of different structure and have clearly observable high detoxification potentials [Morant et al., 2003].

Transgenic plants have also been studied in connection with degradation of some particular contaminants. For this purpose the widely distributed explosive TNT has generally been chosen. In order to increase the degradability of TNT and similar compounds, the transgenic plants which contained the gene of bacterial enzyme (pentaeritrole tetranitrate reductase, EC 1.6.99.7) were received [French et al., 1999]. Transgenic tobacco has been analysed for its ability to assimilate the residues of TNT and trinitroglycerine. Seedlings of the transgenic plants extracted explosives from the liquid area much faster, accomplishing denitration of nitro groups, than the seedlings of common forms of the same plants, in which growth was inhibited by the contaminants [Hannik et al., 2001]. Transgenic tobacco thus differed substantially from the common plant by its tolerance, fast uptake and assimilation of significant amounts of TNT. Analogous experimental results have been obtained with other plant species [Hanniuk et al., 2002, Kurumata et al., 2004].

There are dozens of publications concerning successful improvement of plant detoxification abilities by cloning the genes of transferases and oxidases, which intensively participate in contaminant transformation processes [Ohkawa et al., 1999, Morant et al., 2003].

Obviously, attempts to improve artificially ecological potential of higher plants will be continued, and results will be more substantial from the viewpoint of their eventual practical realization. The positive effect of

these investigations could be much more impressive if all aspects of the quite complicated and multistage detoxification process would be better elucidated with regard to plants physiology and biochemistry. Such information would allow the creation of more rational and effective strategy for the gene engineering technique application.

Until recently plants were considered as organisms having a naturally limited potential for contaminants conjugation and accumulation. The last decade has clearly revealed the potential of plants to absorb and decompose organic contaminants and accumulate inorganic contaminants from soil, water and air. Depending on the nature of the organic xenobiotic and the type of plant, typically 1 kg of green biomass takes up from the air daily amounts ranging from microgram's to tens of milligrams of pollutants [Ugrekheldidze, Durmischidze, 1980, Ugrekheldidze et al., 1997, Kvesitadze et al., 2006]. Plants possessing the universal cleaning up (i.e. applicable to soil, groundwater and air) capabilities are the only agents carrying out the process of remediation by transporting metals to above ground parts of plants. Some plants are indeed known as hyperaccumulators of metals. For the superterranean instance transgenic plants of Indian mustard, poplar, tobacco, *Thlaspi*, *Arabidopsis*, etc. possess especially high potentials for metal accumulation and transportation [Peuke et al., 2004., Macek et al., 2002, 2004].

Elimination of contaminants located deeper than two metres in the soil is connected with limitations in time, since mass transfer processes at that depth and deeper proceeds much more slowly than in the upper parts. Hence the extraction by roots and subsequent transport may become the rate-limiting factor of the whole process. Therefore, plant-microbial action-based technologies would need excessive time to achieve a satisfactory clean standard of soil. In case of contaminants high concentration, phytoremediation as a final "polishing step" must follow other technologies such as excavation, treatment or disposal, etc. Other case when phytoremediation is not successfully applied is the high concentrations of soil contaminants such as polychlorinated biphenyls and dioxins. At high concentrations of these compounds no plants can grow up in contaminated soil. In such extraordinary cases phytoremediation technology alone in any real time cannot clean up the soil.

On the other hand plants are very promising detoxifiers *qua* ecologically safe technologies around hotbeds of contamination [Kvesitadze., et al 2006], (Vegetation cap, Phytoremediation cover, Hydrologic control, Evapotranspiration cover or any other plant based technology) are ecologically friendly and of significant ecological importance. Elaboration of a new ecological concept, unifying worldwide experience accumulated for last 30 years and realizing of new plant-based approaches in the world scale

should lead to the increase of the ecological potential of the whole planet. The universality of phytoremediation consists in the uptake nearly of all types of organic contaminants and heavy metals and their accumulation in intracellular structures or oxidative mineralization.

Owing to the still wide terrestrial and aquatic distribution of plants we should consider these organisms as a very important biological instrument having tremendous ecological potential.

References

1. *Tsao D. T.* Phytoremediation. Advances in biochemical engineering and biotechnology. – 2003. – **78**. – Springer, Berlin Heidelberg New York, 206 p.
2. *Korte F., Kvesitadze G., Ugrekhelidze D., et al.* Review: Organic toxicants and plants // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2000. – **47**. – P. 1–26.
3. *Ugrekhelidze D., Korte F., Kvesitadze G.* Uptake and transformation of benzene and toluene by plant leaves // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 1997. – **37**. – P. 24–28.
4. *Sandermann H.* Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver” concept // *Pharmacogenetics*. – 1994. – **4**. – P. 225–241.
5. *Kvesitadze G., Khatisashvili G., Sadunishvili T., Ramsden J. J.* Mechanisms of detoxification: the basis of phytoremediation. – 2006. – Berlin Heidelberg, Springer, 262 p.
6. *Chrikishvili D., Sadunishvili T., Zaalishvili G.* Benzoic acid transformation via conjugation with peptides and final fate of conjugates in higher plants // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2006. – **64**. – P. 390–399.
7. *Martinova E.* An ATP-dependent glutathione-S-conjugate “export” pump in the vacuolar membrane of plants // *Nature*. – 1993. – **364**. – P. 247–249.
8. *Coleman J. O. D., Mechteld M. A., Kalff B., Davies T. G. E.* Detoxification of xenobiotics in plants: chemical modification and vacuolar compartmentalization // *Trends Plant Sci.* – 1997. – **2**. – P. 144–151.
9. *Sandermann H.* Pestizid-Rückstände in Nahrungspflanzen. Die Rolle des pflanzlichen Metabolismus // *Naturwissenschaften*. – 1987. – **74**. – P. 573–578.
10. *Eckardt N. A.* Move it on out with MATEs // *Plant Cell*. – 2001. – **13**. – P. 1477–1480.
11. *Robineau T., Batard Y., Nedelkina S. et al.* The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics // *Plant Physiol.* – 1998. – **118**. – P. 1049–1056.
12. *Hansikova H., Frei E., Anzenbacher P., Stiborova M.* Isolation of plant cytochrome P450 and NADPH: cytochrome P450-reductase from tulip bulbs (*Tulipa fosteriana*) // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1994. – **13**. – P. 149–169
13. *Schuler M. A.* Plant cytochrome P450 monooxygenases // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 1996. – **15**. – P. 235–284.
14. *Morant M., Bak S., Moller B. L., Werck-Reichhart D.* Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2003. – **2**. – P. 151–162.

15. *Fonné-Pfister R., Kreuz K.* Ring-methyl hydroxylation of chlortoluron by an inducible cytochrome P450-dependent enzyme from maize // *Phytochemistry*. – 1990 – **9**. – P. 2793–2804.
16. *Mougin C., Cabanne F., Canivenc M-C., Scalla R.* Hydroxylation and N-demethylation of chlortoluron by wheat microsomal enzymes // *Plant Sci.* – 1990. – **66**. – P. 195–203.
17. *Didierjean L., Gondet L., Perkins R. et al.* Engineering herbicide metabolism in tobacco and Arabidopsis with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from Jerusalem artichoke // *Plant Physiol.* – 2002. – **130**. – P. 179–189.
18. *Shinohara A., Kamataki T., Ichimura Y. et al.* Drug oxidation activities of horse-radish peroxidase, myoglobin and cytochrome P-450cam reconstituted with synthetic hemes // *Jap. J. Pharmacol.* – 1984. – **45**. – P. 107–114.
19. *Wilson L., Williamson T., Gronowski J. et al.* Characterization of 4-nitro-*o*-phenyldiamine activities by plant systems // *Mutat. Res.* – 1994. – **307**. – P. 185–193.
20. *Laurent F. M. G.* Chloroaniline peroxidation by soybean peroxidases // *Pestic. Sci.* – 1994. – **40**. – P. 25–30.
21. *Adamia G., Ghogheridze M., Graves D. et al.* Absorption, distribution and transformation of TNT in higher plants // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2006. – **64**. – P. 136–145.
22. *Sánchez-Ferrer A., Rodríguez-López J. N., García-Cánovas F., García-Carmona F.* Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism // *Biochim Biophys Acta.* – 1994. – **1247**. – P. 1–11.
23. *Guillén F., Gymez-Toribio V., Martínez M. J., Martínez A. T.* Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – **382**. – P. 142–147.
24. *Kvesitadze G., Gordeziani M., Khatishvili G. et al.* Review: Some aspects of the enzymatic basis of phytoremediation // *J. Biol. Phys. Chem.* – 2001. – **1**(2). – P. 49–57.
25. *Colombo J. C., Cabello M. N., Arambarri A. M.* Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure culture of imperfect and ligninolytic fungi // *Environ. Pollut.* – 1996. – **94**. – P. 355–362.
26. *Niku-Paavola M. L., Viikari L.* Enzymatic oxidation of alkenes // *J. Mol. Cat.* – 2000. – **10**. – P. 435–444.
27. *Collins P. J., Dobson A. D. W.* Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – **63**. – P. 3444–3450.
28. *Johannes C., Majcherczyk A.* Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – **66**. – P. 524–528.
29. *Cassagne C., Lessire R.* Studies on alkane biosynthesis in epidermis of *Allium porrum* L. leaves. 4. Wax movement into and out of the epidermal cells // *Plant Sci Lett.* – 1975. – **S5**. – P. 261–266.
30. *Durmishidze S., Ugrekhelidze D., Djikiya A.* Absorption and transformation of benzene by higher plants (in Russian) // *Fiziologiya i Biochimiya Kulturnikh Rastanii.* – 1974. – **6**. – P. 217–221.

31. *Durmishidze S., Ugrekhelidze D., Djikiya B.* Absorption and transformation of toluene by higher plants (in Russian) // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 1974. – **10**. – P. 673–676.
32. *Mithaishvili T., Scalla R., Ugrekhelidze D. et al.* Transformation of aromatic compounds in plants grown in aseptic conditions // *Z. Naturforsch.* – 2005. – **60**. – P. 97–102.
33. *Durmishidze S., Djikiya A., Lomidze E.* Uptake and transformation of benzidine by plants in sterile conditions (in Russian) // *Dokladi Akademii Nauk SSSR.* – 1979. – **247**. – P. 244–247.
34. *Tateoka T. N.* Studies on the catabolic pathway of protocatechuic acid in mung bean seedlings // *Bot Mag (Tokyo).* – 1970. – **83**. – P. 49–54.
35. *Hawf L. R., Behrens R.* Selectivity factors in the response of plants to 2,4-D // *Weed Sci.* – 1974. – **22**. – P. 245–249.
36. *McComb A. J., McComb J. A.* Differences between plant species in their ability to utilize substituted phenoxybutyric acids as a source of auxin for tissue culture growth // *Plant Sci. Lett.* – 1978. – **11**. – P. 227.
37. *Taylor H., Wain R.* Studies of plant growth-regulating substances. 52. Growth retardation by 3,5-dichlorophenoxyethylamine and 3,5-dichlorophenoxybutyric acid arising from their conversion to 3,5-dichlorophenoxyacetic acid in tomato plants // *Ann. Appl. Biol.* – 1978. – **89**. – P. 271–277.
38. *Buadze O., Sadunishvili T., Kvesitadze G.* The effect of 1,2-benzanthracene and 3,4-benzpyrene on the ultrastructure on maize cells // *Int. Biodeterior. Biodegradation.* – 1998. – **41**. – P. 119–125.
39. *Zaalishvili G., Lomidze E., Buadze O. et al.* Electron microscopic investigation of benzidine effect on maize root tip cell ultrastructure, DNA synthesis and calcium homeostasis // *Int. Biodeterior. Biodegradation.* – 2000. – **46**. – P. 133–140.
40. *Ohkawa H., Tsujii H., Ohkawa Y.* The use of cytochrome P450 genes to introduce herbicide tolerance in crops: a review // *Pestic. Sci.* – 1999. – **55**. – P. 867–874.
41. *French C. E., Hosser S. J., Davies G. J. et al.* Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – **17**. – P. 491–494.
42. *Hannink N., Rosser S. J., French C. E. et al.* Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase // *Nat. Biotechnol.* – 2001. – **19**. – P. 1168–1172.
43. *Hannink N., Rosser S. J., Bruce N. C.* Phytoremediation of explosives // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 2002. – **21**. – P. 511–538.
44. *Li Z. S., Szczyпка M., Lu Y. P. et al.* The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**. – P. 6509–6517.
45. *Lu Y. P., Li Z. S., Rea P. A.* AtMPR1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**. – P. 8243–8248.

46. Song W. Y., Sohn E. J., Martinoia E. et al. Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants // *Nat. Biotechnol.* – 2003. – **21**. – P. 914–919.
47. Peuke A. D., Kopriva S., Rennenberg H. Phytoremediation with the help of transgenic trees / In: *Phytoremediation: environmental and molecular biological aspects*. OECD workshop, Hungary, Abstr. – 2004. – P. 33.
48. Ugrekhelidze D., Durmishidze S. The biosphere chemical pollution and plant (in Georgian). Metsniereba, Tbilisi. – 1980.
49. Macek T., Macková M., Pavliková D. et al. Accumulation of cadmium by transgenic tobacco // *Acta Biotechnologica*. – 2002. – **22**. – P. 101–106.
50. Macek T., Sura M., Francova K. et al. Approaches using GM plants for the removal of xenobiotics (Cd, Ni, PCB) including experiments in real contaminated soils / In: *Phytoremediation: environmental and molecular biological aspects*. OECD workshop, Hungary, Abstr. – 2004. – P. 27.

PLANT TISSUE CULTURE IN BIOTECHNOLOGY: RECENT ADVANCES IN TRANSFORMATION THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS

Vladimir A. SIDOROV

Monsanto Co., 700 Chesterfield Parkway W., St. Louis, MO 63017, USA;
e-mail: vladimir.sidorov@monsanto.com

Plant genetic transformation has become an important biotechnology tool for the improvement of many crops. A solid foundation for the fast development and implementation of biotechnology in agriculture was provided by achievements in plant tissue culture. On the 30th anniversary of plant transformation, I report the advancements, recent challenges and shifts in methodology of transformation. The main focus of this paper will be on conventional and novel approaches for genetic improvements of soybean, cotton and corn. I will also highlight results on the transformation of these crops that have considerably been improved by modern biotechnology.

The development of cell, tissue and organ culture methods was rapidly accelerated in the second half of the previous century after establishing robust cell culture techniques and media formulation for *in vitro* growth of plant material [1–8]. A stunning number of articles have been published on *in vitro* induction and maintenance of non-differentiated cells and the regeneration of the plants from them whether through organogenesis or somatic embryogenesis. Fine protocols were established for the culture of enzymatically isolated single cells and protoplasts [9], which were able to regenerate into plants [10–12]. *In vitro* culture methods became an essential part of many micropropagation protocols. Culture of plant cells and organs in bioreactors were used for the production of different secondary metabolites and pharmaceuticals. *In vitro* techniques were used for production of mutants, haploids, virus-free material, and also for maintenance and preservation of rare genotypes and specific cell cultures [13–15].

The first positive results on *Agrobacterium*-mediated transformation in plants were reported in 1983 [16–18]. A simple method for transferring genes into plants through the inoculation of leaf discs with *Agrobacterium*

Abbreviations: IE: immature embryos, EC: embryogenic callus, 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 6BA: 6 benzylaminopurine, Picl: picloram, Kin: kinetin, *uidA* gene (GUS): beta-glucuronidase, GFP: green fluorescent protein, *NPTII*: neomycin phosphotransferase II, MS: Murashige and Skoog medium, PGR: plant growth regulators, TF: transformation frequency.

tumefaciens followed by *in vitro* culture and regeneration of whole plants was reported by Horsch et al. [19]. Different methods for DNA delivery into plant cell, including electroporation [20], PEG treatment [21, 22], microinjection [23], sonication [24], biolistics or particle bombardment [25], silicon carbide Whiskers™ treatment [26, 27], were used for specific transformation purposes and different types of cells and genotypes. However, *Agrobacterium*-mediated transformation became a preferred method. *Agrobacterium tumefaciens* is a natural vector system for transgenes delivery into a wide range of plants species, providing an efficient and “clean” insertion of DNA into the plant genome and deserved to be called the “tzar of genetic engineering” [28]. In the past 30 years the discovery and application of new transformation technologies essentially sped up the improvement of major cultivated crops. The first, really commercially grown plants hit the market in the mid – 1990’s.

Practically all transformation systems were based on *in vitro* culture methods. It was impossible to transform the whole plant organism at once. All techniques were based on transforming single cells of callus, leaves, pollen, roots or other organs and than regeneration of plants through somatic embryogenesis or organogenesis. Routine and highly efficient transformation methods for many important crop and particular genotypes were implemented in many biotechnology companies. However, laborious and time consuming *in vitro* methods of transformation limited the production of transgenic events. The biotechnology industry requires simple, high throughput, genotype independent transformation systems, which also could be marker- and selection-free. Whole plants, seeds, mature embryos, flowers, meristems, stolons and other plant organs became a target for transformation with a purpose to produce transgenic plants without using *in vitro* methods. The application of meristematic cultures has become a valuable tool for transformation of some recalcitrant species since it is less genotype dependant and due to possible short culture period had less potential problems with somaclonal variation [29].

In this report, as a tribute to cell biologists and their huge impact in development of modern biotechnology, the overview of conventional techniques used for transformation of important crop plants and some advancement in this area will be presented. Comprehensive reviews on molecular aspects of transformation and on milestones in plant tissue culture can be found elsewhere [30, 31]. Herein the information on transformation will be updated with the emphasise on transformation through embryogenesis in some legumes, woody plants and cereals which are commonly considered as recalcitrant.

Soybean transformation

Roundup Ready® soybean developed by Monsanto was one of the first transgenic crop commercialized in 1996. For the development of this new product a bacterial gene for a glyphosate-tolerant variant of EPSP synthase (CP4) [32] was transferred, by particle bombardment, into embryonic axes of excised soybean embryos, which were regenerated into plants by organogenesis [33]. Further improvements in soybean transformation were made with the development of *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledon explants, which also underwent organogenesis [34]. Considerable advancement in soybean transformation was observed after development of new high throughput technology based on *Agrobacterium*-mediated transformation of excised mature embryos [35, 36]. In the meantime a lot of research was concentrated on the development of embryogenic culture transformation and/or regeneration of plants through somatic embryogenesis [37, 38]. First efficient induction of embryogenic culture from immature cotyledons was described by Lippmann and Lippmann [39]. The most reproducible particle bombardment transformation system was based on soybean embryogenic culture protocols which came from the labs of Finer and Parrott [40–42]. Soybean embryogenic cultures were also transformed by using *Agrobacterium* [43, 44] but this method turned out to be less efficient and not always reproducible.

Although embryogenic cultures of soybean are not the best target for transformation, some biotechnology laboratories and companies are still using it for commercial production of transgenic plants. Since it was demonstrated that somatic embryos could be comparable to seeds in terms of quantity and especially quality of oil and protein [45–47], the transformation of embryogenic cultures and production of transgenic soybean somatic embryos has been used in assays for rapid analysis of seed traits [48]. To some extent the wide application of embryogenic culture in transformation was limited due to genotype dependence. The cultivar Jack has given the best *in vitro* response, however, other genotypes can also be used for induction of embryogenic culture but with lower efficiency.

For the initiation of somatic embryos from immature cotyledons the MSD40 medium containing 40 mg/l 2,4-D [49] is commonly used. MSD20, which is the same medium as MSD40 but with 20 mg/l 2,4-D, is used for maintenance of embryogenic culture. For liquid culture the FN Lite medium [50] with 10 mg/l 2,4-D plus 0.5 mg/l Picl (or 0.1 mg/l Kin) is recommended. Embryogenic cultures on MSD20 are more developed, while on FN Lite the culture is more globular and much greener. The established embryogenic cultures are usually transformed by biolistic methods. Detailed conditions and media for induction of culture and

transformation with biolistics can be found in different publications [41, 51, 52]. Hygromycin was mainly used for selection of transgenic embryo-cultures.

At Monsanto our research confirmed the feasibility of using embryogenic cultures for transformation and a transformation system was developed with *NPTII* as selectable marker. Embryogenic cultures were established from immature cotyledons of Jack and other genotypes. The scheme for isolation of immature cotyledons from pods and the induction of somatic embryos is shown on Fig. 1A. Initiation of somatic embryos from immature cotyledons and the morphology of callus on MS40 and FN Lite medium can be seen on Fig. 1B, C, D.

Efficient delivery of foreign DNA (*NPTII*/GFP construct) was established by particle bombardment. A young embryogenic callus grown in a dim light on MS20 medium was used as a target for bombardment. In spite of efficient DNA delivery into cells (high transient GFP expression was observed after 24 h of culture, Fig. 2A) the recovery of stable transformants was very low. Several antibiotics and different selection pressure were tested for selection. It was found that kanamycin even at concentration of 200 mg/l did not bleach and inhibit the growth of green embryogenic cultures. Paromomycin with an optimal concentration 50 mg/l was suitable for selection. First stable transgenic events were usually identified after 3 weeks of selection (Fig. 2B). Selected callus was propagated in the presence

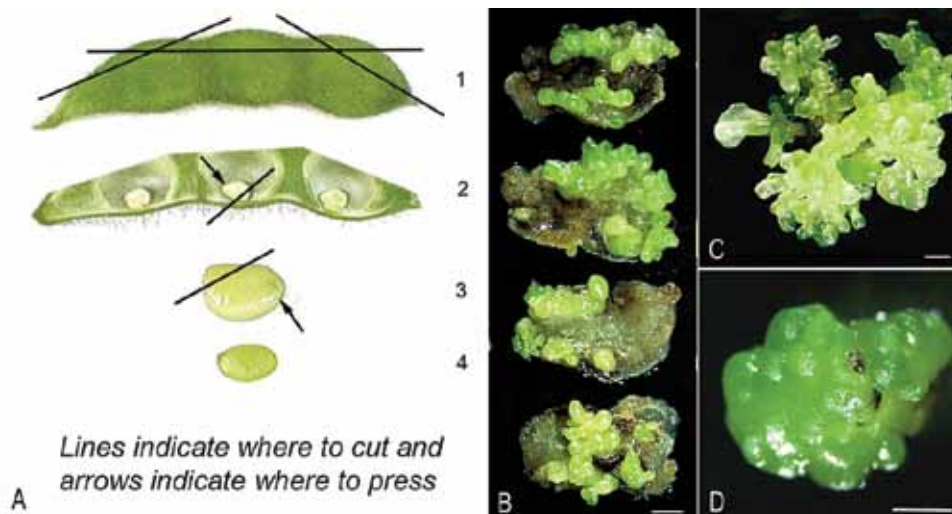


Fig. 1. Scheme for isolation of immature cotyledons from a soybean pod (A), induction of somatic embryos on MS40 medium (B) and embryogenic callus on MS20 and FN Lite media (C, D). Bar: 1 mm

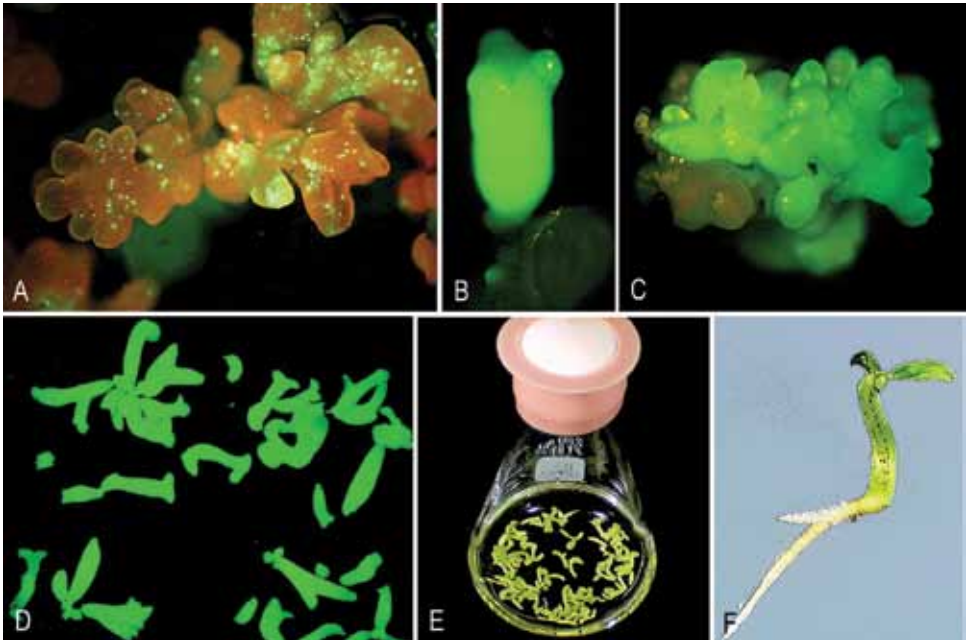


Fig. 2. *A*: Transient GFP expression in soybean embryogenic callus (1 day after bombardment with NPTII/GFP construct). *B*, *C*, *D*: GFP expression in single somatic embryo, callus and mature somatic embryos obtained from embryogenic callus after 9 days of culture on SHAM medium. *E*, *F*: Maturation of somatic embryos in suspension culture and their germination

of paromomycin and then transferred to a new medium for embryogenesis (Fig. 2C, D). Very fast embryogenesis and embryo maturation was established on SHAM medium (modification of FNL0S3 [52]). The embryos after 9 days of culture on this medium are shown (in a blue and day light) on Fig. 2D, E. After maturation the developed embryos were germinated on SHAM or MS media without plant growth regulators (PGR).

In general, the low transformation frequency (TF) of soybean embryogenic cultures, observed in our work and in other reports, is probably due to the origin of the transformation target which is highly developed multicellular somatic embryos, and their sensitivity to selection agents. Even in spite of repetitive formation of somatic embryos observed in *in vitro* cultures, the chances for recovery of transgenic events are low. Due to development of novel and extremely robust alternative transformation techniques it is difficult to see a wide application of soybean embryogenic cultures in commercial production of genetically modified soybean plants,

although it is still very valuable for fundamental research and for development of different transformation assays.

Cotton transformation

Cotton is another economically important agricultural crop which is transformed by *Agrobacterium* or particle bombardment and mainly regenerated via somatic embryogenesis. Insect resistant, Bollgard® cotton, which was first transformed in 1987 [53, 54], was commercially released in 1996. Cotton is woody dicotyledonous plant, and it is truly recalcitrant to *in vitro* regeneration with very strict genotype dependence. Since the first reports on transformation, successful regeneration via embryogenesis is mainly limited to cotton varieties with a Coker pedigree. Although regeneration of cotton via organogenesis has been reported [55], there are only a few available publications on transformation and regeneration through organogenesis [56, 57]. *Agrobacterium*-mediated transformation of Coker genotype with regeneration by means of somatic embryogenesis was the most efficient method for generating transgenic cotton plants [58, 59]. This method, however, is labor-intensive and time-consuming. *Agrobacterium*-mediated transformation system *via* embryogenesis usually requires a period of up to twelve months for production of transgenic cotton plants and in comparison with other crops is rather inefficient. Regeneration and transformation methods were also established for other cotton genotypes [60–63] and, in spite of low efficiencies, were utilized for specific needs.

Other methods, like particle bombardment [64, 65] or Whiskers™-mediated transformation [66], have been exploited for the transformation of embryogenic cotton suspension cultures. There are also a few reports on pollen and pollen-tube-pathway transformations [67, 68]. In several protocols the transformation of the meristem in the shoot apex with particle bombardment or *Agrobacterium* was used [69–71]. A similar approach was applied by Balasubramani et al. [56] who conducted *Agrobacterium* transformation of the embryonic axis of germinated seeds. In these intact plant tissue cases the transformation is rapid and genotype-independent. Since there is no callus stage and practically no cell dedifferentiation (it is based on multiple shoot formation), the chances of somaclonal variation are low. At the same time very light selection pressure used for meristem transformation can often be associated with chimerism of the produced shoots and plants [59]. No doubt that such methods with further improvements will be used as the foundation and essence for new industrial technologies.

Here it will be summarized the improvements made at Monsanto on the conventional transformation of Coker 130 genotype through embryogenesis which were presented earlier [72]. This protocol is similar to others and includes several steps: 1) *Agrobacterium tumefaciens* inoculation

of hypocotyls cuttings and co-culture, 2) Induction of “creamy and soft” friable, undifferentiated callus, 3) Initiation and selection of embryogenic callus (EC), 4) Embryo maturation and germination, 5) Transplanting into soil. We developed and implemented a liquid-based culture system that drastically increases the efficiency of plant production. For protocol development *Agrobacterium tumefaciens*, a modified C58 strain of the bacterium with *NPTII/GFP* and *NPTII/GUS* constructs and kanamycin selection (70 mg/l) were used. Some production steps of transgenic cotton are illustrated on Fig. 3.

Callus induction was performed in plates with liquid medium. With a new culture system we could speed up the production of EC and eliminate multiple sub-culturing. Higher concentration of gelling agent in the regeneration medium especially covered with nylon “mesh” (100% nylon organza fabric) provided faster conversion of embryogenic callus and matu-

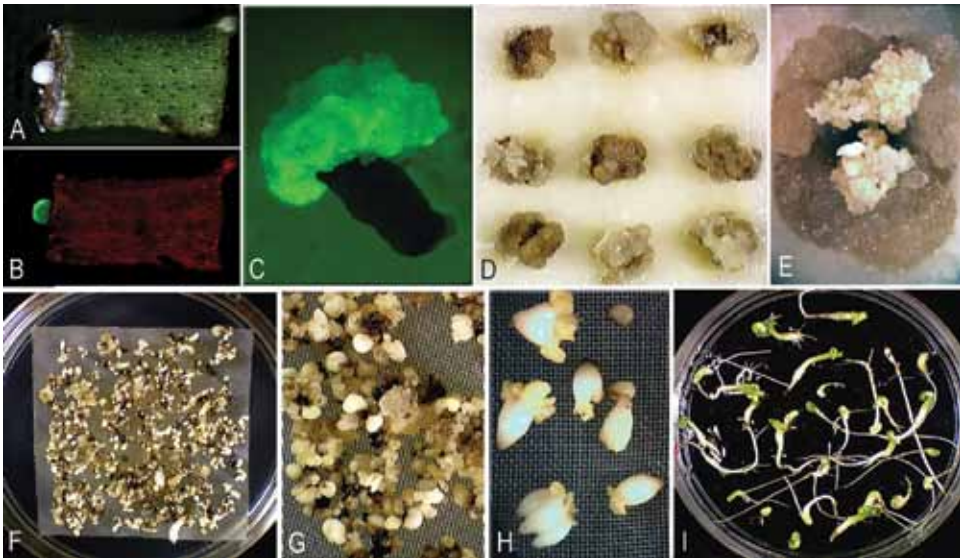


Fig. 3. Different stages of cotton hypocotyls transformation. **A–E:** Transgenic callus formation in liquid WPSEL medium which contains Lloyd and McCown salts according to Phytotechnology Labs, 2 ml/l Gamborgs B5 vitamins (500 x, Phytotechnology Labs, 0.1 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l kinetin, 30 g/l glucose, pH 5.8). **A,B:** 7 d old callus under day and blue light; **C:** GFP expression in 1 month old callus; **D:** 1 month old callus, cultured in a liquid medium; **E:** EC formation after 3 month of selection; **F, G:** Formation of globular embryos on TRP medium (MS salts and 2 ml/l Gamborg B5 vitamins according to Phytotechnology Labs, 0.1 g/l casein hydrolysate, 30 g/l glucose, 2.5 g/l Phytigel®, pH 5.8); **H:** Embryo maturation on TRP medium with 7 g/l agarose; **I:** Embryo germination on ShSu medium (Stewart and Hsu salts and vitamins [73], 5 g/l sucrose, 2.5 g/l Phytigel, pH 6.8)

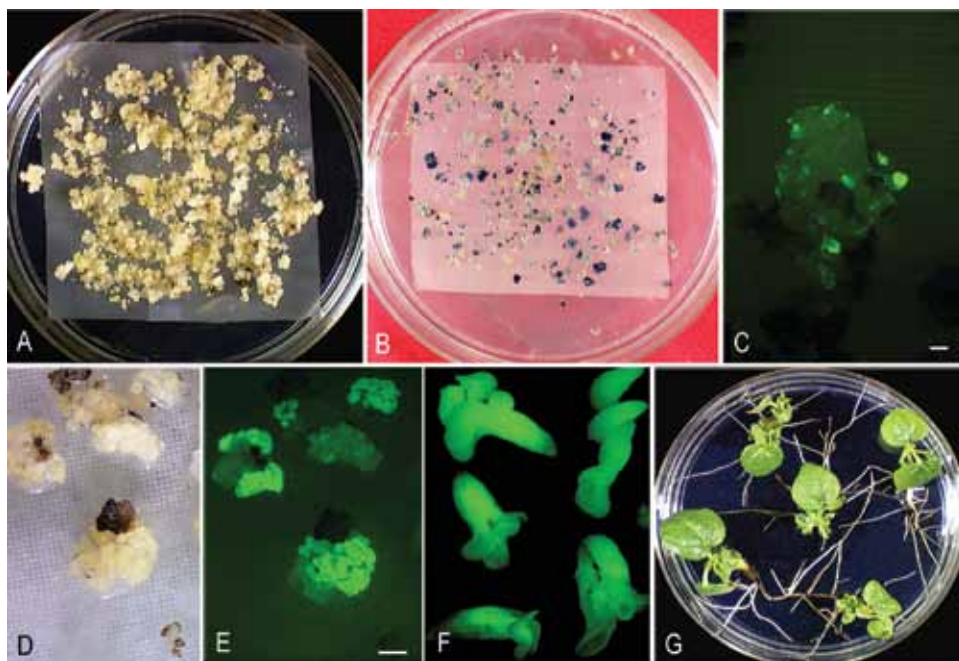


Fig. 4. Agrobacterium-mediated transformation of embryogenic callus. A: Friable EC used for transformation; B: Transient GUS expression in embryogenic callus; C: GFP expression after 14 days of selection; D, E: Callus culture under blue and day light after 1.5 month; F: GFP expression in somatic embryos during maturation after 2.5 months; G: Plantlet formation from somatic embryos after their maturation. Bar: 1 mm

ration of embryos (see Fig. 3F, G, H). Overall, with an optimized liquid transformation system the time frame for plant production could be cut a half.

Further improvements were connected with the development of *Agrobacterium*-mediated transformation system based on using EC as an initial explant. The initial EC material was easy to maintain on the medium without growth regulators and could be transformed with *Agrobacterium* only if EC was desiccated during co-culture with the bacteria. Earlier it was demonstrated that desiccation during co-culture enhances the T-DNA delivery into plant cells and could be critical for transformation of callus [74]. Using GFP and GUS as reporter marker it was shown that transgenic plants could be produced in about 3 months after transformation (Fig. 4).

Corn transformation

Corn is one of the most economically important crops which was considerably improved by modern biotechnology. Although the first positive results on the transformation of corn and regeneration of transgenic plants were reported in 1990 [75, 76] only in 1997 did Monsanto Company bring to the marketplace the GMO plant, insect-protected corn in the form of YieldGard® Corn Borer. Similar products were developed by other companies. In 1996 Ciba-Geigy and Mycogen introduced E-176 corn and in 1997 Novartis introduced Bt-11corn. Particle bombardment of corn embryogenic cultures was used for producing the first product. Later not only single traits but stacked traits were added to corn products. To create biotech products two transformation techniques for transgenes delivery have mainly been employed: *Agrobacterium*-mediated transformation [77–80] and particle bombardment transformation [81, 82]. Although corn, like other cereals, is not a natural host for *Agrobacterium* sp., *Agrobacterium*-based transformation is the preferred method and has several advantages over biolistics. New *Agrobacterium*-transformation methods are very efficient and in comparison to bombardment provide a higher number of events with single intact transgenes. Now new products like Genuity™SmartStax™ (Monsanto), Herculex® Xtra Roundup® Corn 2 (Dow Agrosciences and Pioneer Hi-Bred), Agrisure® GT/CB/LL (Syngenta), Optimum® AcreMax® Insect Protection (Pioneer Hi-Bred, DuPont) and many other have combinations of stacked traits against different insects and tolerance to a number of herbicides for broad spectrum weed control. In 2011 twelve countries have planted biotech crops with two or more traits.

Type I culture in transformation. From the very first publication on corn *in vitro* regeneration [83] it was accepted that somatic embryogenesis is the principal way of plant regeneration in corn and other cereals. The induction of so-called “Type I” callus was established from immature embryos (IE) of inbred line A188. The same compact, organized “embryogenic” type of callus was induced from IEs of number genotypes [84–88]. Right now in most transformation protocols the plants are regenerated through Type I culture. The transformation of IEs and regeneration through somatic embryogenesis or organogenesis is the most popular choice for transgenic plant production. The wide application of *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species and particularly corn became feasible after development of an efficient transformation method for rice described by Hiei et al. [89]. The disarmed *Agrobacterium*, which was induced by acetosyringone and carried a “super binary” vector with selectable marker genes, was used to establish a corn transformation protocol with freshly isolated IEs [78, 80, 90, 91]. After considerable improvement

Agrobacterium-mediated transformation of freshly isolated or pre-cultured IEs became a routine practice for efficient production of transgenic corn [80, 92]. However, some corn genotypes possess a high competence for embryogenesis and regeneration but they are not susceptible to *Agrobacterium*. In Fig. 5 a high level of GUS and GFP transient expression in IEs of proprietary genotype, L1 is shown (Fig. 5B, C), and poor transient GUS expression in IEs of another tested proprietary genotype L2 (Fig. 5A).

In order to obtain a high TF with “difficult” genotype it could be necessary to do an essential protocol modification and media optimization. Very often it can be easier to screen the breeders potential candidate-genotypes for “culturability” (competent for *in vitro* culture and regeneration) and “transformability” (competent for transformation) using several standard protocols. Sometimes it could be a good idea to test for transformation of other explants. Thus, one genotype which was difficult to transform using freshly isolated IEs (Fig. 5A) turned to be highly transformable, when young callus cells of cultured IEs were used as initial explants for transformation (Fig. 5D).

High TF can be achieved with freshly isolated IEs or propagated *in vitro* callus obtained from IEs or seedlings [80, 93]. Because of potential somaclonal variation, extended maintenance of callus *in vitro* is not recommended. Production of seedling-derived callus using mature seeds has a high impact on transformation technology since it is considered as “greenhouse-independent” (it does not require growing plants for IEs). Transformation technology based on using seedling-derived callus can be efficiently utilized in dihaploid programs and potentially speed up the breeding process. Haploid Type I callus can be produced from seedlings of

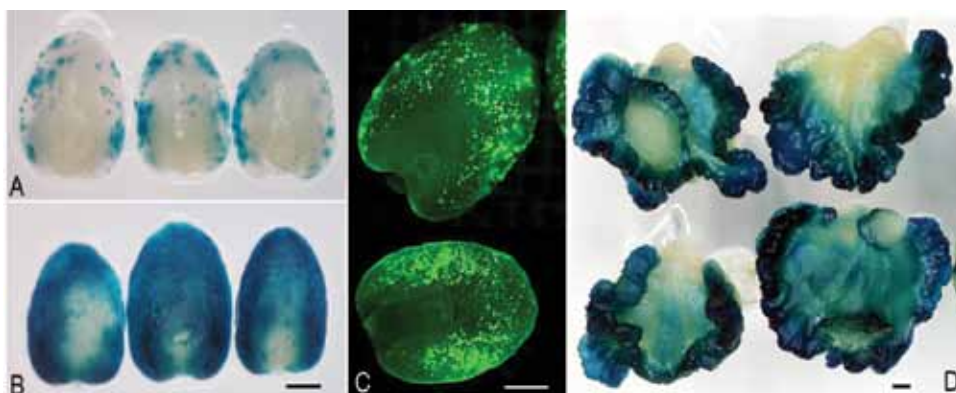


Fig. 5. Transient GUS and GFP expression in freshly isolated (A, B, C different genotypes) and transient GUS expression in callus cells after culturing of IEs for 8 days. GUS staining for 3 hours. Bar = 0.5 mm

haploid seeds conventionally obtained after crossing a corn variety with a haploid inducer line. Haploid seeds are easy to identify due to the presence in the inducer line of visible pumule and cap markers. Routinely about 75% of haploid callus lines from seedlings remain haploid. Isolated haploid callus can be transformed and after doubling homozygote dihaploid transformed plants can be regenerated [94, 95].

Different selection scheme can be used for preferential growth of transformed cells and regeneration of transgenic plants. For commercial production of transgenic plant genes conferring resistance to antibiotics, herbicides and mannose have been used [96]. Selectable marker genes can be removed since they are not required for expression of the gene of interest. There are several methods available for marker removal from transgenic plants: co-transformation with 2 unlinked T-DNAs (“2T transformation”) followed by segregation of the marker gene in progeny [97–99], homologous recombination between direct repeats [100] and site-specific recombination, including the most popular *Cre/lox* system [101, 102]. Extremely appealing is marker-free, selection-free transformation technology [103, 104].

Only with very high TF it is possible to do the transformation without selection and conduct identification of transgenics by molecular screening of all produced shoots or plants. Since we developed a very efficient IEs transformation protocol for L1 line with TF in some experiments higher than 60% we checked the feasibility of using no selection for production of transgenic plants.

Using ABI *Agrobacterium* containing a construct with the *uidA* (GUS) reporter gene we tried to track the formation of stable transgenic events during different stages of culture and evaluate the efficiency of transformation without selection. After 10 days of culture post- transformation with no selection it was found that almost all IEs formed a callus with several GUS positive regions. After several weeks of culture the callus derived from each IE was divided into 10-20 pieces and cultured further (Fig. 6). It was found that all callus pieces from a single IE were GUS negative, a few were chimeric and one was non-chimeric, GUS positive. A similar picture was observed in several other cases when the batch of callus pieces derived from single IE were stained. Among plants regenerated without selection we also identified several GUS positive (Fig. 6D). Although in our experiments the TF was very low this method after improvements of screening at the callus stage can be useful. Such a marker-free/selection-free protocol allows doing the transformation of corn with 1T constructs without any additional markers and in comparison to transformation with 2T constructs it reduces the breeding timeframe and simplifies the downstream breeding process.

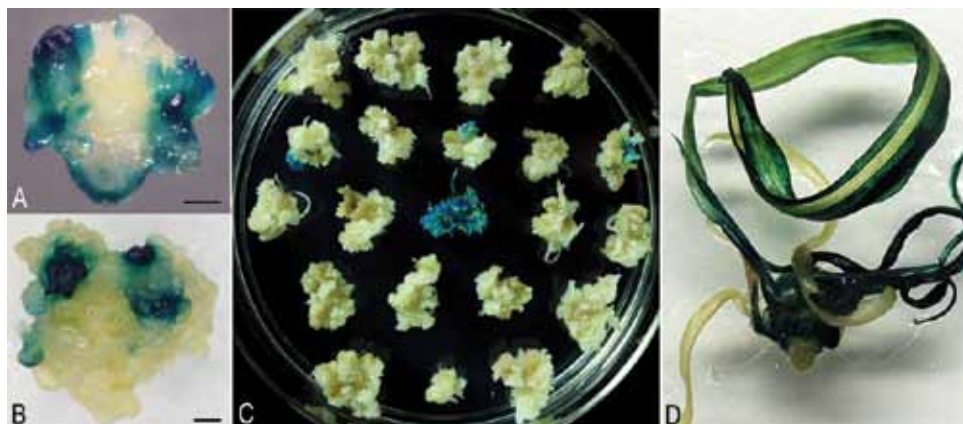


Fig. 6. *GUS* expression in callus derived from IEs on different stages of culture and regeneration (without selection) after transformation with *GUS* construct. **A, B:** Transient *GUS* expression in IEs callus after 6 days and 14 days of culture. **C:** Callus pieces on regeneration medium; one transformant and few himeric clumps were identified among callus pieces originated from one IE. **D:** *GUS* positive plantlets from no-selection experiment. Bar: 1 mm

Type II culture in transformation. A new type of embryogenic callus named as “Type II” was described by Green [105, 106] and Armstrong, Green [107]. Type II culture derived from immature embryos is a very fine, friable callus which can directly form somatic embryos. Efficient induction and sustainable propagation of embryogenic callus was established with A188 inbred genotype on N6 [7] medium supplemented with 6 mM proline [107]. The induction of this type of callus is highly genotype dependent. It was demonstrated that many hybrids which have A188 as one parent also demonstrate the embryogenic response found in A188. The well - known genotype with Type II response is “Hi-II” derived from progeny of A188 x B73 cross [108]. Quantitative trait loci (QTLs) that control regenerable callus formation and plant regeneration in maize have been identified for the Type II callus response [109, 110]. Embryogenic Type II callus was usually initiated from IEs but the induction of such culture from immature tassels of HiII genotype has also been reported [111]. The Hi-II line is not an inbred but Lowe et al. [112], after crossing Hi-II with the FBLL genotype followed by multiple backcrosses transferred the Type II embryogenic response developing the FBLL-MAB inbred line. The availability of suitable inbred lines for transformation is particularly desirable since modern breeding of corn is based on the utilization of inbred parents for production of hybrid seeds possessing “hybrid vigor” or heterosis. It is typical that breeding/biotechnology companies have their own proprietary

germplasm that are bred for traits like yield or disease resistance not for *in vitro* “culturability” and “transformability”. Some of these elite genotypes require, for *in vitro* growth, completely new combinations of PGR in media for them to be transformed with high efficiency. It was demonstrated that Type II callus is not limited to A188 genotypes or close relatives and can be obtained from different genotypes [113, 114]. Type II callus can be directly used for transformation [76] and can be a good source for protoplast isolation and production of transgenic plants [115]. Still, genotype specificity is much higher for Type II callus than for Type I callus. Due to the high genotype dependence the regeneration through somatic embryogenesis from Type II callus has been used less and less in the commercial transformation of corn.

Meristem culture in transformation. Corn and other cereals can also be regenerated via organogenesis. First multiple shoot formation from apical meristem of immature embryos was reported in 1992 [116]. Induction of organogenic cultures from corn seedling meristem was described by Zhong et al. [117, 118]. The same type of culture was initiated from meristematic tissue of the nodal area of seedlings, leaf bases of young leaves and other explants containing highly meristematic cells. The culture medium for multiple shoot induction usually contains high concentration of cytokinins (0.5-10 mg/l 6BA) and no or low concentration of auxins (0-0.5 mg/l 2,4-D). The same or similar types of media were used for multiple shoot induction in oat [119], sorghum [120], millet [121], wheat [122], barley [123] and other monocots. Meristem culture depending on the stage of development may have multiple buds resembling shoot apex with apical meristem and primordial leaf, enlarged buds, highly meristematic zones with multiple buds or more developed multiple shoots (Fig. 7). Meristem shoot culture can be maintained for extended period of time and can easily produce plants on the medium without PGR [124].

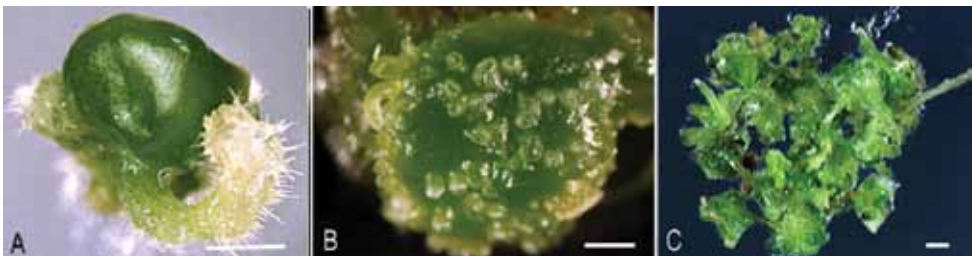


Fig. 7. Different development stages of corn shoot meristem culture. **A:** Enlarged bud, **B:** Adventitious buds formation from highly meristematic tissue, **C:** Established meristem shoot culture. Bar: 2 mm

Shoot apical meristems and derived organogenic cultures were recommended for use as sustainable explants for genetic transformation of cereal crops [119]. This organogenic type of culture, referred to as apical meristem culture, shoot meristematic culture, multiple shoot culture, and multiple bud culture, has been transformed by particle bombardment [125, 126]. The induction of this type of tissue appears to be less dependent on specific genotype in comparison to Type II and Type I cultures [119]. For wide implementation of organogenic culture in production work it still requires the development of efficient delivery of foreign DNA via *Agrobacterium*.

General remarks on corn morphogenesis. The morphology, characteristics of Type I, Type II, and meristem culture with the possible conversion pathway of one type culture to another are presented on Fig. 8.

Depending on the genotype the conversion of one type of culture to another can be very fast but often requires several subcultures. Conversion

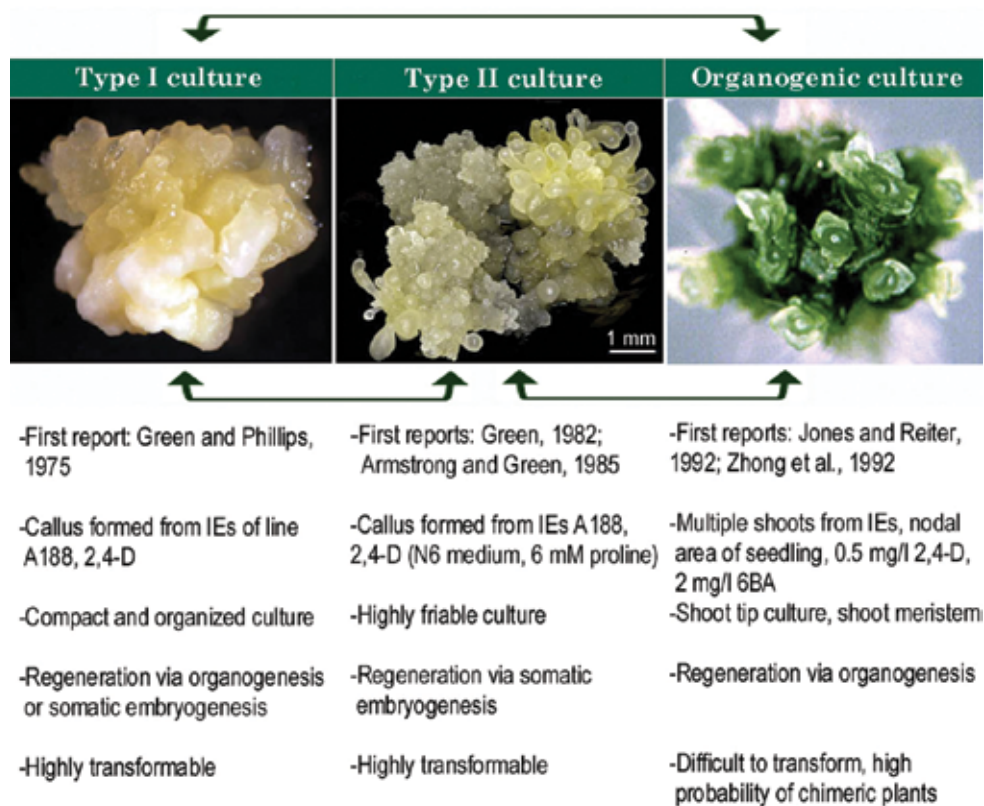


Fig. 8. Regenerable types of *in vitro* corn culture, their main characteristics, and conversion pathway of one type culture to another



Fig. 9. Conversion of organogenic meristem culture of LH198 x HiIII (A) and L1 line (B) into Type I callus. Bar: 2 mm. C, D, E: Conversion of FBLL-MAB Type II callus into meristem culture with multiple buds; 2 and 4 weeks culture on MSV34 medium [80]. Bar: 0.9 mm

of organogenic meristem culture of LH198 x HiIII and L1 line into Type I callus is presented below (Fig. 9A, B). Conversion of FBLL-MAB Type II callus into shoot meristem culture is shown on Fig. 9C, D, E.

In scientific lexicon Type I culture is commonly described as “embryogenic” which is not completely correct. It is known that term somatic embryogenesis describes a developmental process of somatic cells which results in morphological structures similar to zygotic embryos and typically had a distinct developmental stages. In comparison to Type II callus which is truly embryogenic, Type I callus is not. It is more organogenic since at light condition it easily converts into leafy structures and forms shoots (Fig. 10).

Detailed histochemical and ultrastructural study shows that Type II callus does contain embryogenic units (which give rise to somatic embryos)

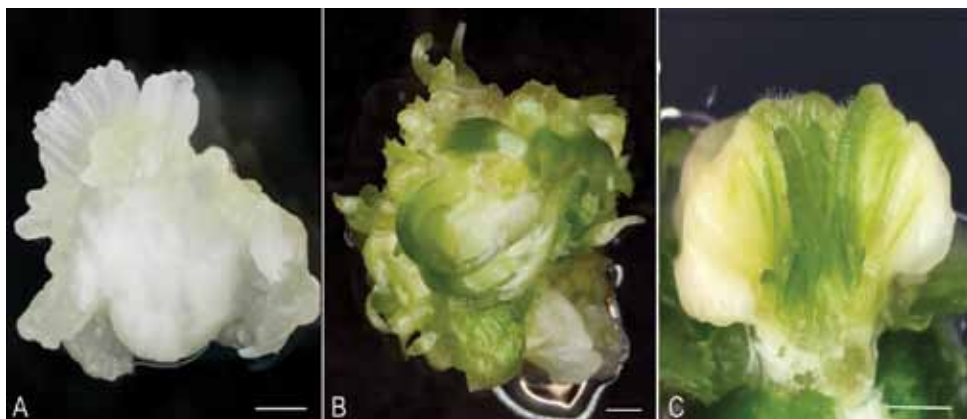


Fig. 10. A: Type I callus formation from IE LH198 x HiII (in dark). B: The same IE cultured another 10 days on the same medium (on light). C: Piece of callus on higher magnification which converts into leafy structures. Bar: 1 mm



Fig. 11. A, B: Multiple buds and shoots formation in corn after 1 week culture on 6BA containing medium, followed by PGR-free medium. Bar: 0.5 mm. C, D, E: Germination of corn somatic embryos of L1 line on PGR-free medium. C: Bar: 1 mm, D, E: Bar: 2 mm

while Type I callus has mainly a meristematic cells and extensive vascular network [127, 128]. Greening of this type of callus, formation of leafy structures, followed by multiple buds and shoot formation, are especially pronounced in production experiments where for a fast regeneration the callus is exposed to 6BA (MSBA medium according to [80]) for a short time. As it is shown on Fig. 11, Type I callus after a short culture in light on 6BA medium formed green leafy structures with multiple buds at their base. On PGR-free medium these buds formed shoots which could be later rooted. Formation of multiple buds (apical meristem) from Type I callus in corn is demonstrated on Fig. 11A, B. Because of this regeneration pathway there is no stage of somatic embryogenesis and it is proper to call this way of morphogenesis as organogenesis. At the same time the regeneration of Type I callus through embryogenesis is also possible. In several publications compact Type I callus was regarded as “fused deformed and normal somatic embryos with an incomplete shoot-root axis” [129, 130]. Biochemical analyses of Type I callus have also shown the presence of specific markers of embryogenesis in this type of callus [131, 132]. It was confirmed that Type I callus on PGR-free medium in darkness can produce very fine callus clumps which could initiate single somatic embryos in the suspension culture (Fig. 11C, D, E). Because of presence of two types of cells which regenerate through organogenesis or embryogenesis probably it would be more correct simply to call Type I callus as regenerable callus and refer only Type II callus as embryogenic.

In conclusion, it is expected that the presented results on corn, especially in comparison to the data on other species regenerated through embryogenesis, will clarify some peculiarities of corn culture and transformation. Hopefully this will be useful for researchers to work on further improvements of transformation technologies.

Acknowledgment

I would like to thank Dave Duncan and Chuck Armstrong for critical review of the manuscript.

This review is dedicated to Prof. S. Komisarenko on his 70th anniversary in honor of his landmark accomplishments in biochemistry and modern biotechnology.

References

1. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — **15**. — P. 473–479.
2. Eriksson T. Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis* // *Physiol. Plant.* — 1965. — **18**. — P. 976–993.
3. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. // *Exp. Cell Res.* — 1968. — **50**. — P. 148–151.

4. Nitsch J. P., Nitsch C. Haploid plants from pollen grains // Science. – 1969. – **163**, N 3862. – P. 85–89.
5. Schenk R. U., Hildebrandt A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // Can. J. Bot. – 1972. – **50**. – P. 199–204.
6. Kao K. N., Michayluk M. R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta. – 1975. – **126**. – P. 105–110.
7. Chu C. C., Wang C. C., Sun C. S., et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources // Sci. Sin. – 1975. – **18**. – P. 659–668.
8. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Proc. Int. Plant Prop. Soc. – 1980. – **30**. – P. 421–427.
9. Cocking E. C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles // Nature. – 1960. – **187**. – P. 962–963.
10. Nagata T., Takebe L. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts // Planta. – 1970. – **92**. – P. 301–308.
11. Frearson E. M., Power J. B., Cocking E. C. The isolation, culture, and regeneration of Petunia protoplasts // Develop. Biol. – 1973. – **33**. – P. 130–137.
12. Nagy J. I., Maliga P. Callus induction and plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Nicotiana sylvestris* // Z. Pflanzenphysiol. – 1976. – **78**. – P. 453–455.
13. Gamborg O. L., Phillips G. C. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – Springer-Verlag, 1995. – 348 p.
14. Hall R. D. Plant Cell Culture Protocols. Humana Press. Totowa, New Jersey, 1999. – 421 p.
15. Singh M. P., Kumar S. Plant Tissue Culture. APH Publishing. New Delhi, 2009. – 286 p.
16. Fraley R. T., Rogers S. B., Horsch R. B. Use of a chimeric gene to confer antibiotic resistance to plant cells. // Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals. Miami Winter Symposia. – 1983. – **20**. – P. 211–221.
17. Framond A. J., Bevan M. W., Barton K. A. et al. Mini-Ti plasmid and a chimeric gene construct: new approaches to plant gene vector construction. // Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals. Miami Winter Symposia. – 1983. – **20**. – P. 159–170.
18. Schell J., Van Montagu M., Holsters M. Ti plasmids as experimental gene vectors for plants. // Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals. Miami Winter Symposia. – 1983. – **20**. – P. 191–209.
19. Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L. et al. A simple and general method for transferring genes into plants. // Science. – 1985. – **227**. – P. 1229–1231.
20. Fromm M. E., Taylor L. P., Walbot V. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. // Nature. – 1986. – **319**, N 6056. – P. 791–793.
21. Lorz H., Baker B., Schell J. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. // Mol. Gen. Genet. – 1985. – **199**. – P. 178–182.

22. Potrykus I., Saul M. W., Petruska J. et al. Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot. // *Mol. Gen. Genet.* – 1985. – **199**. – P. 183–188.
23. Reich T. J., Iyer V. N., Miki B. I. Efficient transformation of alfalfa protoplasts by the intranuclear microinjection of Ti plasmid // *Biotechnology.* – 1986. – **4**. – P. 1001–1004.
24. Joesbro M., Brunstedt J. Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonication // *Plant Cell Rep.* – 1990. – **9**. – P. 207–210.
25. Klein T. M., Wolf E. D., Wu R., Sanford J. C. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells // *Nature.* – 1987. – **327**. – P. 70–73.
26. Kaeppler H. F., Gu W., Somers D. A. et al. Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells // *Plant Cell Rep.* – 1990. – **8**. – P. 415–418.
27. Frame B. R., Drayton P. R., Bagnall S. V. et al. Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation // *Plant J.* – 1994. – **6**. – P. 941–948.
28. Tzfira T., Citovsky V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. // *Curr. Opin. Biotech.* – 2006. – **17**. – P. 147–154.
29. Duncan D. R. Organogenesis and embryogenesis in plant genetic transformation / In: *Plant Transformation Technology Revolution in Last Three Decades*, Vol. 1. Yinghui Dan and David W. Ow (eds.). Science. – 2011. – P. 46–54.
30. Tzfira T., Citovsky V. (eds). *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. Springer. – 2008. – 737 p.
31. Vasil I. K. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. // *Plant Cell Rep.* – 2008. – **27**. – P. 1423–1440.
32. Barry G., Kishore G., Padgett S. et al. Inhibitors of amino acid biosynthesis: Strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. In: B. K. Singh et al.(eds). *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*. Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD.– 1992. – P. 139–145.
33. McCabe D. E., Swain W. F., Martinell B. J., Christou P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. // *Bio/Technol.* – 1988. – **6**. – P. 923–926.
34. Hinchee M. A., Ward D.-C., Newell R. E. et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. // *Bio/Technol.* – 1988. – **6**. – P. 915–922.
35. Martinell B. J., Julson L. S., Emler C. A. et al. Soybean transformation method. US Patent 7,002,058 B2. – 2006.
36. Martinell B. J., Julson L. S., Emler C. A. et al. Soybean transformation method. US Patent 08030076. – 2011.
37. Parrott W. A., Clemente T. E. Transgenic soybean. In: *Soybean: Improvements, Production, and Uses*, 3rd ed. Agronomy Monograph no 16. – 2004. – P. 265–301.
38. Yamada T., Takagi K., Ishimoto M. Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis // *Breed Sci.* – 2012. – **61**(5). – P. 480–494.
39. Lippmann B., Lippmann G. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean, *Glycine max* L. Merr. // *Plant Cell Rep.* – 1984. – **3**. – P. 215–218.

40. *Finer J. J., Nagasawa A.* Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.) // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1988. – **15.** – P. 125–136.
41. *Finer J. J., McMullen M. D.* Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 1991. – **27.** – P. 175–182.
42. *Parrott W. A., Williams E. G., Hildebrand D. F., Collins G. B.* Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1989. – **16.** – P. 15–21.
43. *Parrott W. A., Hoffman L. M., Hildebrand D. F. et al.* Recovery of primary transformants of soybean // *Plant Cell Rep.* – 1989. – **7.** – P. 615–617.
44. *Trick H. N., Finer J. J.* Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue // *Plant Cell Rep.* – 1998. – **17.** – P. 482–488.
45. *Cahoon E. B., Marillia E-F., Stecca K. L. et al.* Production of fatty acid components of meadow-foam oil in somatic soybean embryos. // *Plant Physiol.* – 2000. – **124.** – P. 243–251.
46. *Herman E. M., Helm R. M., Jung R., Kinney A. J.* Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean // *Plant Physiol.* – 2003. – **132.** – P. 36–43.
47. *Schmidt M. A., Tucker D. M., Cahoon E. B., Parrott W. A.* Towards normalization of soybean somatic embryo maturation // *Plant Cell Rep.* – 2005. – **24.** – P. 383–391.
48. *Lightner J. E., Okuley J. J., Hitz W. et al.* Genes for microsomal delta-12 fatty acid desaturases and hydroxylases from plants. US Patent 6,372,965. – 2002.
49. *Bailey M. A., Boerma H. R., Parrott W. A.* Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean // *In Vitro Cell Dev. Biol.* – 1993. – **29.** – P. 102–108.
50. *Samoylov V. M., Tucker D. M., Parrott W. A.* Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic cultures: the role of sucrose and total nitrogen content on proliferation // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* – 1998. – **34.** – P. 8–13.
51. *Trick H. N., Dinkins R. D., Santarem E. R. et al.* Protocols. Recent advances in soybean transformation // *Plant Tissue Culture and Biotechnology.* – 1997. – **3,** N 1. – P. 9–26.
52. *Samoylov V. M., Tucker D. M., Thibaund-Nissen F., Parrott W. A.* A liquid-medium-based protocol for rapid regeneration from embryogenic soybean cultures // *Plant Cell Rep.* – 1998. – **18.** – P. 49–54.
53. *Umbeck P., Johnson G., Barton K., Swain W.* Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants // *Biotechnology.* – 1987. – **5.** – P. 263–266.
54. *Firoozabady E., DeBoer D. L., Merlo D. J., et al.* Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants // *Plant Mol Biol.* – 1987. – **10.** – P. 105–116.
55. *Khan T., Singh A. K., Pant R. C.* Regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis in different cultivars of cotton (*Gossypium* spp.) // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2006. – **42.** – P. 498–501.

56. Balasubramani G., Amudha J., Mayee C. D. Genetic transformation of cotton (*G. hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration by direct shoot organogenesis // Adv. Plant Sci. – 2005. – **18**. – P. 497–504.
57. Yuceer S. U., Koc N. K. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton plants // Russ. J. Plant Physiol. – 2006. – **53**. – P. 413–417.
58. Wilkins T. A., Mishra R., Trolinder N. L. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton // Food Agric. Environ. – 2004. – **2**. – P. 179–187.
59. Duncan D. R. Cotton transformation / In: Cotton, Biotechnology in Agriculture and Forestry. U. B. Zehr (ed.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. – 2010. – **65**. – P. 65–77.
60. Sakhanokho H. F., Zipf A., Rajasekaran K., et al. Induction of highly embryogenic calli and plant regeneration in upland (*Gossypium hirsutum* L.) and pima (*Gossypium barbadense* L.) cottons // Crop Sci. – 2001. – **41**. – P. 1235–1240.
61. Mishra R., Wang H. Y., Yadav N. R., Wilkins T. A. Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxa) – a step towards genotype-independent regeneration // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2003. – **73**. – P. 21–35.
62. Wu J. H., Zhang X. L., Nie Y. C. et al. Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of Chinese cottons (*Gossypium hirsutum* L.) // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2004. – **40**. – P. 371–375.
63. Sun Y., Zhang X., Huang C. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from different wild diploid cotton (*Gossypium*) species // Plant Cell Rep. – 2006. – **25**. – P. 289–296.
64. Finer J. J., McMullen M. D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment // Plant Cell Rep. – 1990. – **8**. – P. 886–889.
65. Rajasekaran K., Hudspeth R. L., Cary J. W. et al. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures // Plant Cell Rep. – 2000. – **19**. – P. 539–545.
66. Beringer J., Palta A. M., Baker L. W. et al. Transgenic cotton via WhiskersTM-mediated transformation // Recent Res. Devel. Crop Sci. – 2004. – **1**. – P. 335–347.
67. Li X., Wang X. D., Zhao X., Dutt Y. Improvement of cotton fiber quality by transforming the *acsA* and *acsB* genes into *Gossypium hirsutum* L. by means of vacuum infiltration // Plant Cell Rep. – 2004. – **22**. – P. 691–697.
68. Huang G. C., Dong Y. M., Sun J. S. Introduction of exogenous DNA into cotton via the pollen-tube pathway with GFP as a reporter // Chin. Sci. Bull. – 1999. – **44**. – P. 698–701.
69. McCabe D. E., Martinell B. J. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristem // Biotechnology. – 1993. – **11**. – P. 596–598.
70. Gould J. H., Magallanes-Cedeno M. Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*-mediated transformation // Plant. Mol. Biol. Rep. – 1998. – **16**. – P. 1–10.

71. Zapata C., Park S. H., El-Zik K. M., Smith R. H. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex // Theor. Appl. Genet. – 1999. – **98**. – P. 252–256.
72. Sidorov V., Subbarao S., Layton J. et al. Transformation system improvements in cotton. 12th IAPB Congress, June 6-11, 2010, St. Louis, Missouri. Poster Abstracts. – 2010. – P. 166.
73. Stewart J. Mc.D., Hsu C. L. In ovulo embryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // Planta. – 1977. – **137**. – P. 113–117.
74. Cheng M., Hu., Layton J. et al. Desiccation of plant tissue post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2003. – **39**. – P. 595–604.
75. Fromm M. E., Morrish F., Armstrong C. et al. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants // Bio/Technol. – 1990. – **8**. – P. 833–839.
76. Gordon-Kamm W. J., Spencer T. M., Mangano M. L. et al. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants // Plant Cell – 1990. – **2**. – P. 603–618.
77. Grimsley N., Hohn T., Davis J. W., Hohn B. *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants // Nature. – 1987. – **325**. – P. 177–179.
78. Ishida Y., Saito H., Ohta S. et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Nat. Biotechnol. – 1996. – **14**. – P. 745–750.
79. Miller M., Tagliani L., Wang N. et al. High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system. // Transgenic Res. – 2002. – **11**. – P. 381–393.
80. Sidorov V., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: Immature embryos versus callus. - Methods in Molecular Biology: Transgenic Maize, – V. **526**. M. Paul Scott (ed.), Humana Press. – 2009. – P. 47–58.
81. Brettschneider R., Becker D., Lorz H. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. // Theor. Appl. Genet. – 1997. – **69**. – P.737–748.
82. Shou H., Frame B., Whitham S., Wang K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. // Mol. Breed. – 2004. – **13**. – P. 201–208.
83. Green C. E., Phillips R. L. Plant regeneration from tissue culture of maize. // Crop Sci. – 1975. – **7**. – P. 417–421.
84. Lu C., Vasil I. K., Ozias-Akins P. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. // Theor. Appl. Genet. – 1982. – **62**. – P. 109–112.
85. Lu C., Vasil V., Vasil I. K. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of maize (*Zea mays* L.). // Theor. Appl. Genet. – 1983. – **66**. – P. 285–289.
86. Duncan D. R., Williams M. E., Zehr B. E., Widholm J. M. The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* L. genotypes. // Planta. – 1985. – **165**. – P. 322–332.

87. Close K. R., Ludeman L. A. The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. // *Plant Sci.* – 1987. – **52**. – P. 81–87.
88. Carvalho C. H. S., Bohorova N., Bordallo P. N. et al. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotype. // *Plant Cell. Rep.* – 1997. – **17**. – P. 73–76.
89. Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. // *Plant. J.* – 1994. – **6**. – P. 271–282.
90. Zhao Z. Y., Gu W., Cai T., Pierce D. A. Methods for *Agrobacterium*-mediated transformation // US Patent 5,981,840. – 2001.
91. Negrotto D., Jolley M., Beer S. et al. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation // *Plant Cell Rep.* – 2000. – **19**. – P. 798–803.
92. Zhao Z. Y., Ranch J. Transformation of maize via *Agrobacterium tumefaciens* using a binary co-integrate vector system. - *Methods in Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols.* – V. M. Loyola-Vargas and F. Vazquez-Flota (eds.), Humana Press, 2006. – **318**. – P. 315–323.
93. Sidorov V., Gilbertson L., Addae P., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus // *Plant Cell Rep.* – 2006. – **25**. – P. 320–328.
94. Sidorov V., Brar G., Foley T., Duncan D. Transformation of haploid corn and the production of dihaploid transgenic plants. *Plant & Animal Genome XIV.* January 14–18, 2006. San Diego, Ca. Abstracts. – P. 272.
95. Armstrong C. L., Duncan D. R., Sidorov V. A. Method for *Agrobacterium* transformation for dihaploid corn plants // US Patent 07,572,635, – 2009.
96. Jones T. J. Maize tissue culture and transformation: the first 20 years. – *Molecular genetic Approaches to Maize Improvement. Biotechnology in Agriculture and Forestry.* – Springer-Verlag, 2009. – **63**. – P. 7–22.
97. Depicker A., Herman L., Jacobs A. et al. Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium*/plant cell interaction. // *Mol. Gen. Genet.* – 1985. – **201**. – P. 477–484.
98. De Frammond A., Back E., Chilton W. et al. Two unlinked T-DNAs can transform the same tobacco plant cell and segregate in the F1 generation. // *Mol. Gen. Genet.* – 1986. – **202**. – P. 125–131.
99. McCormac A. C., Fowler M. R., Chen D. F., Elliott M. C. Efficient co-transformation of *Nicotiana tabacum* by two independent T-DNAs, the effect of T-DNA size and implications for genetic separation // *Trans. Res.* – 2001. – **10**. – P. 143–155.
100. Zubko E., Scutt C., Meyer P. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes // *Nat. Biotechnol.* – 2000. – **18**. – P. 442–445.
101. Dale O. C., Ow D. W. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – **88**. – P. 10558–10562.

102. Zhang W., Subbarao S., Addae P. et al. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants // Theor. Appl. Genet. – 2003. – **107**. – P. 1157–1168.
103. De Vetten N., Wolters A. M., Raemakers K. et al. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop // Nat. Biotechnol. – 2003. – **21**. – P. 439–442.
104. Jia H., Liao M., Verbelen J. P., Vissenberg K. Direct creation of marker-free tobacco plants from agroinfiltrated leaf discs // Plant Cell Rep. – 2007. – **26**. – P. 1961–1965.
105. Green C. E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays* / In: Plant Tissue Culture. A. Fujiwara (ed.). Maruzen, Tokyo. – 1982. – P. 107–108.
106. Green C. E. New developments in plant tissue culture and regeneration / In: Basic Biology of New Developments in Biotechnology. A. Hollaender, A. I. Laskin, P. Rogers (eds.). Plenum, New York. – 1983. – P. 195–209.
107. Armstrong C. L., Green C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline // Planta. – 1985. – **1985**. – P. 207–214.
108. Armstrong C. L., Green C. E., Phillips R. L. Development and availability of germplasm with high type II culture formation response // Maize Genet. Coop. Newsl. – 1991. – **65**. – P. 92–93.
109. Armstrong C. L., Romero-Severson J., Hodges T. Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by R.F.L.P. analysis // Theor. Appl. Genet. – 1992. – **84**. – P. 755–762.
110. Cowen N. M., Johnson C. D., Armstrong K., et al. Mapping genes controlling in vitro androgenesis in maize using RFLP analysis // Theor. Appl. Genet. – 1992. – **84**. – P. 720–724.
111. Songstad D. D., Petersen W. L., Armstrong C. L. Establishment of friable embryogenic (Type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (*Poaceae*) // Amer. J. Bot. – 1992. – **79**, N 7. – P. 761–764.
112. Lowe B. A., May M. M., Rout J. et al. Molecular assisted breeding for transformability in maize // Mol. Breed. – 2006. – **18**. – P. 229–239.
113. Morocz S., Donn G., Nemeth J., Dudits D. An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture // Theor. Appl. Genet. – 1990. – **80**. – P. 721–726.
114. Huang X-Q., Wie Z-L. Successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize elite inbred lines // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2005. – **83**. – P. 187–200.
115. Golovkin M. V., Abraham S., Morocz S. et al. Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts // Plant Sci. – 1993. – **90**. – P. 41–52.
116. Jones T. J., Reiter K. L. The establishment of proliferative shoot meristem cultures from immature embryos of maize // Maize Genetics Conference Abstracts 34(73), Asilomar. – 1992.

117. *Zhong H., Srinivasan C., Sticklen M. B.* Morphogenesis of corn (*Zea mays* L.) in vitro I. Formation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips // *Planta*. – 1992. – **187**. – P. 490–497.
118. *Zhong H., Srinivasan C., Sticklen M. B.* Morphogenesis of corn (*Zea mays* L.) in vitro II. Transdifferentiation of shoots, tassels, and ear primordia from corn shoot tips // *Planta*. – 1992. – **187**. – P. 483–489.
119. *Zhang S., Zhong H., Sticklen M. B.* Production of multiple shoots from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.) // *J. Plant Physiol.* – 1996. – **148**. – P. 667–671.
120. *Zhong H., Wang W., Sticklen M. B.* In vitro morphogenesis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench: efficient plant regeneration from shoot apices // *J. Plant Physiol.* – 1998. – **153**. – P. 719–726.
121. *Devi P., Zhong H., Sticklen, M. B.* In vitro morphogenesis of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.): efficient production of multiple shoots and inflorescences from shoot apices // *Plant Cell Rep.* – 2000. – **56**. – P. 546–550.
122. *Ahmad A., Zhong H., Wang W., Sticklen M. B.* Shoot apical meristem: in vitro regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2002. – **38**. – P. 163–167.
123. *Bregitzer P., Tonks D.* Inheritance and expression of transgenes in barley // *Crop Sci.* – 2003. – **43**. – P. 4–12.
124. *Sticklen M. B., Oraby H. F.* Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2005. – **41**. – P. 187–200.
125. *Zhong H., Zhang S., Sun B. et al.* The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and expression of transgenes // *Plant Physiol.* – 1996. – **110**. – P. 1097–1107.
126. *Zhang S., Williams-Carrier R., Lemaux P.* Transformation of recalcitrant maize elite inbreds using in vitro shoot meristematic cultures induced from germinated seedlings // *Plant Cell Rep.* – 2002. – **21**. – P. 263–270.
127. *Fransz P. F., Schel J. H. N.* Cyto differentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*) // *Can. J. Bot.* – 1991. – **69**. – P. 26–33.
128. *Fransz P. F., Schel J. H. N.* An ultrastructural study on the early development of *Zea mays* somatic embryos // *Can. J. Bot.* – 1991. – **69**. – P. 858–865.
129. *Ozias-Akins P., Vasil I. K.* Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L. (wheat): Evidence for somatic embryogenesis // *Protoplasma* – 1982. – **110**. – P. 243–250.
130. *Fransz P. F., Schel J. H. N.* Ultrastructural studies on callus development and somatic embryogenesis in *Zea mays* L. / *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Maize* (ed. Y. P. S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg., 1994. – **25**. – P. 50–65.
131. *Everett N. P., Wach M. Y., Ashwork D. J.* Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred B73 // *Plant Sci.* – 1985. – **41**. – P. 133–140.
132. *Duncan D. R., Kriz A. L., Paiva R. Widholm J. M.* Globulin-1 gene expression in regenerable *Zea mays* (maize) callus // *Plant Cell Rep.* – 2003. – **21**. – P. 684–689.

SPECIFIC SILENCING OF LEUKEMIC ONCOGENES USING RNA-INTERFERENCE APPROACH

T. D. LEBEDEV¹, P. V. SPIRIN¹, N. N. ORLOVA¹, A. S. GORNOSTAEVA¹,
C. STOCKING², V. S. PRASSOLOV^{1*}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy
of Sciences, Moscow, Russia;

²Heinrich-Pette Institute of Experimental Virology
and Immunology, Hamburg, Germany;

*e-mail: prassolov45@mail.ru

RNA-interference is an effective natural mechanism of post-transcriptional modulation of gene expression. RNA-interference mechanism exist as in high eukaryotes both animals and plants as well in lower eukaryotes and viruses. RNA-interference is now used as a powerful tool in study of functional gene activity and many essential for fundamental biology results was obtained with this approach. Also it's widely believed that RNA-interference could be used in working out of new therapeutic medicine against malignant, infectious and hereditary diseases. One of the main problems of these developments is search of effective methods of siRNA transfer into the target cells. At present time for these purpose different sorts of transfections or viral transduction are used. At present article the results of comparison of inhibition of expression of oncogene AML-ETO by synthetic siRNA and by recombinant lentiviruses coding for corresponding shRNA are presented.

The controlled silencing of target genes is important both for molecular biological studies and for related applied sciences: in particular, modern biomedicine.

Among the many gene silencing approaches (which include the use of anti-sense RNA, ribozymes, chemical blockers, and targeted mutagenesis), the most efficient approach is based on RNA-interference.

RNA- interference is a highly specific mechanism for the posttranscriptional silencing of target genes. It involves the degradation of the target gene mRNA. The degradation of mRNA occurs in a complex formed by short-interfering RNA oligonucleotides (siRNA) and cellular proteins such as endonucleases. The nucleotide sequence of siRNA is complementary to that of target gene mRNA.

Abbreviations: AML – Acute Myeloid Leukemia, CBF – core Binding Factor, eGFP – enhanced Green Fluorescent Protein, GTU – GFP transducing units, HDAC – Histone deacetylase, IRES – Internal ribosome entry Site, NHR – nervy Homology region, RHD – runt Homology Domain, VSV-G – Vesicular stomatitis virus G glycoprotein.

In the past couple of years, the use of siRNA has become widespread in studies of gene functioning and gene interaction. The use of siRNA as next generation therapeutic agents in biomedicine is also being explored. It is possible that, in the near future, siRNA will be used for treating viral and oncological diseases.

Currently, short synthetic 21–22-bp double-stranded siRNA molecules are widely used to silence mammalian genes. A number of commercial firms synthesize siRNA oligonucleotides. These commercial firms have siRNA design tools available on their websites (e.g., www.qiagen.com). Synthetic siRNA oligonucleotides are transferred into cells *in vitro* by lipofection. Since siRNA induces the degradation of mRNA (and not the protein directly), the silencing effect does not occur immediately after cell transfection. The silencing effect is generally noticeable within 18 hours of transfection: however, in the case of stable proteins, the silencing effect may be noticeable only 24–48 hours after transfection. The longevity of siRNA silencing is comparatively short, and different sources claim that the silencing effect lasts for 3–5 cell divisions. It should be noted that the longevity of siRNA silencing may depend on many factors, in particular the nature of the cells being transfected. Approaches have been developed to synthetically modify siRNA oligonucleotides, which enhance the longevity of siRNA silencing in cells. Such synthetically modified siRNA oligonucleotides are useful for the post-transcriptional silencing of genes that encode proteins with a long half-life.

For long-lasting gene silencing, shRNA expressing lenti- and retroviral vectors can be used. Nucleotide sequences encoding the sense and anti-sense strands of siRNA separated by a spacer sequence can be cloned into lenti- or retroviral vector constructs using standard molecular biological cloning techniques. The transcription of such nucleotide sequences leads to the formation of shRNA molecules. shRNA molecules form a hairpin structure consisting of two complimentary strands separated by a loop. The cellular endonuclease dicer is responsible for the cleavage of shRNA molecules. As a result, the loop gets removed from shRNA molecules and double-stranded siRNA molecules are formed. These siRNA molecules are capable of initiating the degradation of target gene mRNA.

Within the framework of our project, we were able to silence the expression of activated oncogenes AML1-ETO (t8;21) and RUNX1(K83N) with the help of RNA interference. These activated oncogenes are frequently found in acute myeloid leukemia patients. We were able to compare the efficiency of gene silencing: (a) after the lipofection of oncogene-expressing model cell lines with synthetically modified double-stranded siRNA oligonucleotides and (b) after the transduction of oncogene-expressing model cell lines with shRNA-expressing recombinant lentiviral vector particles.

Oncogene-expressing model cell lines were obtained from murine SC1 embryonic fibroblast cell lines after their transduction with bicistronic retroviral vector particles. These retroviral vectors contained a bicistronic expression cassette comprised of the gene of interest and an eGFP marker gene separated by an IRES sequence and driven by a common promoter. The following genes were selected as genes of interest:

(1) The AML1-ETO fusion gene, which is formed as a result of the t(8:21) chromosomal translocation

(2) The activated RUNX1(K83N) oncogene, which is formed as a result of a point mutation in the RUNX1 gene and leads to the substitution of lysine to asparagine in the 83 position of the RUNX1 protein. Since both the gene of interest and eGFP marker gene are driven by a common promoter, the expression levels of the gene of interest in cells can be evaluated based on the intracellular expression of the eGFP marker gene.

The typical results of transduction efficiency and transgene expression are shown in Fig. 1. Throughout the course of our work, we used the murine SC1 embryonic fibroblast cell line, the HEK 293 cell line, and two transgenic SC1 cell lines expressing either activated oncogene AML1-ETO or RUNX1(K83N). All four cell lines were cultured in standard DMEM medium containing 10% FBS, 4 mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 100 mkg/ml streptomycin, and 100 units/ml penicillin at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

The design and synthesis of double-stranded siRNA molecules was carried out in collaboration with the Institute of chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICBFM SB RAS). The oligonucleotides were synthesized at ICBFM SB RAS using the phosphamide method. During oligonucleotide synthesis, a unique method was used to methylate the oligonucleotides at certain positions. These modifications significantly increase the lifespan of synthetic siRNA in cells. The nucleotide sequences of siRNA oligonucleotides:

AML1-ETO sense 5'-CCUCGAAAUCGUmACUmGAGUAG-3';

AML1-ETO antisense 5'-UCUCmAGUmACGAUUUCGAGGUU-3';

ETO sense 5'-GGCCmAGCGGUmACmAGUCCmAGAU-3';

ETO antisense 5'-UUmGGACUmGUmACCGCUmGGCCUG-3';

AML(5') sense 5'-GAACCmAGGUUmGCmAAGAUUGAA-3';

AML(5') antisense 5'-AAAUCUUmGCmAACCUmGGUUCUU-3';

AML(3') sense 5'-AGCCCGGGAGCUUmGUCCUCUU-3';

AML(3') antisense 5'-AAGGACmAAGCUCCCGGGCUUmG-3'.

Anti-AML1-ETO and anti-RUNX1 siRNA duplexes were transferred into transgenic SC1 cell lines by lipofection using Lipofectamin2000 (Invitrogen) as per the manufacturers protocol. The final concentration of siRNA duplexes in the transfection culture medium was 200 nM. Four

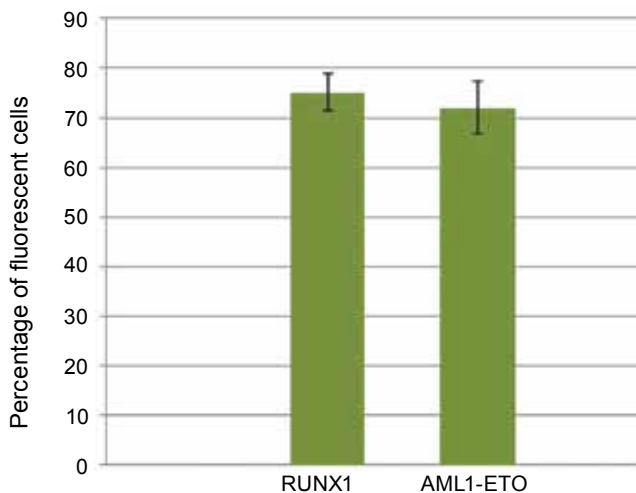


Fig. 1. Efficiency of transgene expression in SC-1 murine fibroblast cell lines transfected with AML1-ETO- and RUNX1-K83N-expressing recombinant retroviral vector particles

hours after transfection, the culture medium was changed to a fresh medium. The transfected cell lines were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 72 hours.

The level of oncogene expression in the cell lines was evaluated by reverse transcription PCR (RT-PCR) and flow cytometry. The total mRNA from the cell lines was extracted using TRIZOL (Invitrogen) as per the manufacturers protocol. The extracted mRNA was used to synthesize the first strands of cDNA using the ImProm-II™ reverse transcriptase (Promega) kit.

PCR with sequence-specific primers was carried out to identify the nucleotide sequences of the genes of interest and eGFP marker gene in the total cDNA. The following primers were used for RUNX1 (K83N): sense-AGTCCTACCAATACCTGGGA; antisense-TCTCAGCTGTG-GTGGTGAAG, for AML1/ETO: sense-CATTTACCCCGAGATAGGAG; antisense-AAGTCCTCGGCGTCACTGAT, for eGFP: sense-ACCTACG-GCCTGCAGTGCTT; antisense-TGCCGTTCTTCTGCTTGTCG. PCR products were then visualized after 1.5% agarose gel electrophoresis. The results were processed using the Gel-Pro Analyzer 4.0 software, which gives a maximum optical density (maxOD) reading. The results were normalized against β-actin.

Cell fluorescence was measured using an epics 4XL Beckman coulter flow cytometer (United States). The WinMDI2.8 software program was used for data collection and data analysis. The diagrams of the percentage

of fluorescent cells in the cell populations are shown in Fig. 2. Cell populations transfected with respective siRNA duplexes are shown along the X axis, while the percentage of fluorescent cells in the population is shown on the Y axis.

Results obtained by flow cytometry correlate well with the results obtained by RT-PCR. The electrophoregram of RT-PCR products is shown in Fig. 3. The reduction of oncogene mRNA is clearly visible in the SC1-AML1/ETO (t8;21) transgenic cell lines transfected with siRNA oligonucleotides targeting the 5'-end of RUNX1 mRNA, ETO mRNA and the site of junction of AML1-ETO mRNA. Oncogene mRNA reduction is also seen in the SC1-RUNX1(K83N) transgenic cell lines transfected with siRNA oligonucleotides targeting the 5'- and 3'-ends of RUNX1 mRNA.

While there is a significant reduction of fluorescence in a portion of the cell population (two times or more) after the addition of synthetic siRNA, there is no such reduction in fluorescence in the rest of the cell population (Fig. 2). This coincides with the results obtained by RT-PCR (Fig. 3). The most likely reason for this is the low efficiency of siRNA delivery into cells. According to the manufacturers of Lipofectamin2000 (Invitrogen), the lipofection efficiency with siRNA oligonucleotides is 50–60% and depends on the nature of the cells being transfected. Apart from this, there is the possibility of a reduction of synthetic siRNA activity due to their enzymatic degradation, which is catalyzed by cellular endonucleases, despite the stabilizing modifications introduced to the siRNA oligonucleotides. According to our data, the maximum interfering activity of synthetically modified siRNA is observed 48–72 hours post transfection.

The gene silencing kinetics of synthetic siRNA oligonucleotides targeting the junction point of AML1-ETO mRNA is illustrated in Fig. 4. The moment of siRNA transfection has been taken as zero-time reference.

It has been shown that the maximum silencing activity of synthetic siRNA is 48–72 hours post transfection, when the percentage of fluorescent cells in the population is around 56%. The percentage of fluorescent cells in the population increases to 67, 92 and 74.39% 96 and 120 hours post transfection, respectively. The results shown are averaged from three parallel measurements and are in reference to a control.

The efficiency of RNA-interference can be increased by increasing the efficiency of siRNA delivery into the model cell lines. For this purpose, taking into account the efficiency of the synthetic siRNA duplexes, two shRNA-expressing lentiviral vectors were constructed targeting the junction point of AML1-ETO mRNA and the 5'-end of RUNX1 mRNA, respectively. The lentivectors were constructed by cloning the shRNA-expressing DNA sequence into the pLSLP vector.

DNA sequence which encodes anti AML1-ETO shRNA:

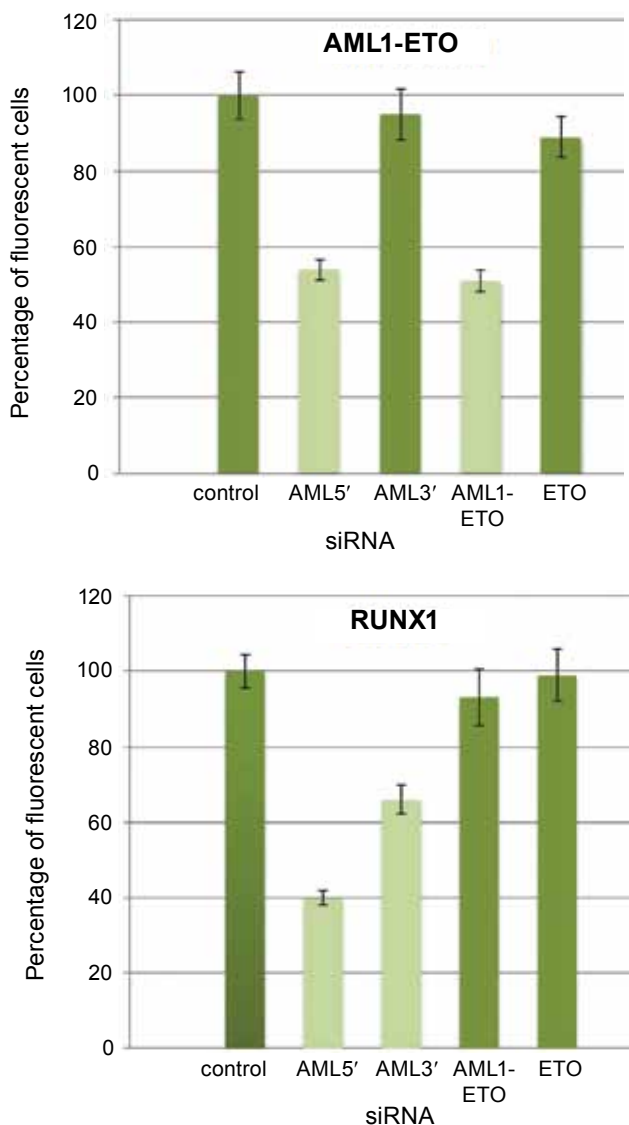


Fig. 2. Results obtained after flow cytometric analysis of cell suspensions. The percentage of fluorescent cells in the AML1-ETO and RUNX1 (K83N) expressing murine fibroblast cell lines 48 hours after transfection with various siRNA duplexes

- AML1-ETO-sense 5'-p-GATCCGCCTCGAAATCGTACTGAG-GCTTCCTGTCATCTCAGTACGATTTTCGAGGTTTTTG-3'

- AML1-ETO antisense 5'-p-AATTCAAAAACCTCGAAATCG-TACTGAGATGACAGGAAGCCTCAGTACGATTTTCGAGGCG-3'

DNA sequence which encodes anti-RUNX1 shRNA:

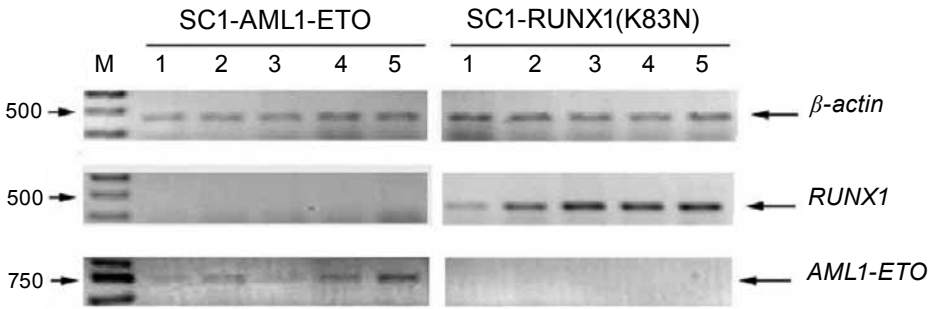


Fig. 3. The electrophoregram of RT-PCR products of total cDNA obtained from oncogene expressing model cell lines transfected with siRNA. 1 – siRNA(AML1-5'), 2 – siRNA(AML1-3'), 3 – siRNA(AML1-ETO), 4 – siRNA(ETO), 5 – Control (without siRNA)

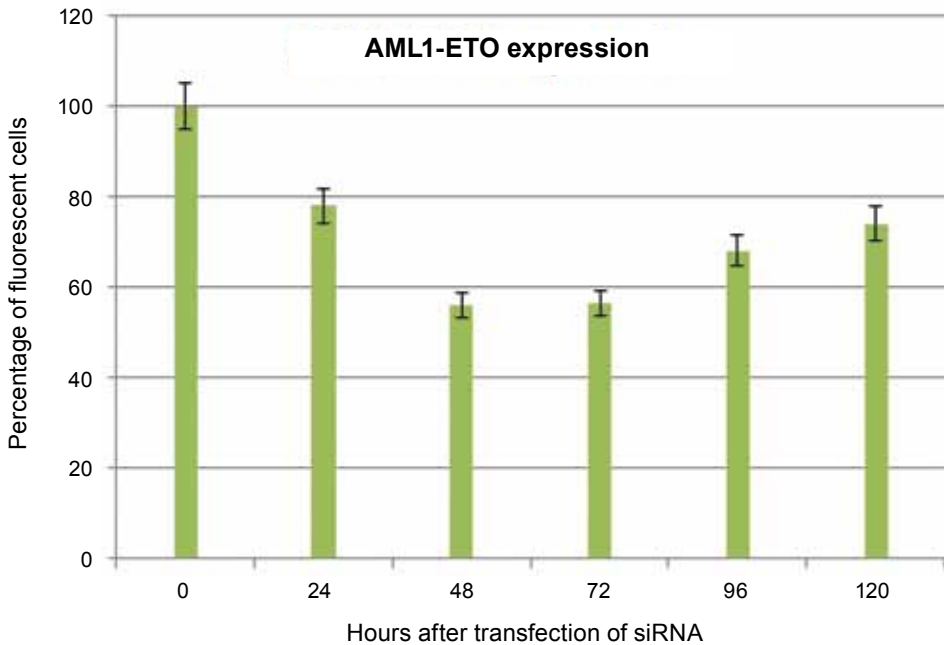


Fig. 4. The gene silencing kinetics of synthetic siRNA oligonucleotides targeting the junction point of AML1-ETO mRNA

- AML-5-sense 5'-p-GATCCGGAACCAGGTTGCAAGATTC-CTTCCTGTCAAATCTTGCAACCTGGTTCTTTTG-3'

- AML-5-antisense 5'-p-AATTCAAAAAGAACCAGGTTGCAAGATTTGACAGGAAGGAATCTTGCAACCTGGTTCCG-3'

The design of the shRNA-coding DNA sequences was done through an internet resource (http://gesteland.genetics.utah.edu/sirnA_scales/index.html). Standard genetic engineering techniques were used for all cloning procedures. The shRNA-expressing lentiviral vectors are shown in Fig. 5.

The transient cotransfection of HEK293T cells with shRNA-expressing lentiviral vectors and packaging plasmids was done for the production of shRNA-expressing lentiviral vector particles. The transfection was carried out using Lipofectamin2000 (Invitrogen) as per the manufacturers' protocol. Viral stocks were harvested for three days and used for the infection/transduction of the transgenic model cell lines expressing the activated oncogenes AML1-ETO and RUNX1 (K83N). Forty-eight hours after transduction/infection, the model cell lines were placed in culture media containing puromycin (10 mkg/ml) for five days. After selection for puromycin resistance, the shRNA expressing transduced model cell lines were analyzed by flow cytometry.

The percentage of fluorescent cells in the SC1-AML1/ETO(t8;21) transgenic cell line decreased 6 times after their transduction with shRNA-expressing lentiviral vector particles targeting the junction point of AML1-ETO mRNA (Fig. 6). Similar results were seen when the SC1-AML1/ETO(t8;21) and SC1-RUNX1(K83N) cell lines were transduced with shRNA-expressing lentiviral vector particles targeting the 5'-end of RUNX1 mRNA. The percentage of fluorescent cells in the cell lines decreased 8 and 8,5 times, respectively. It should be noted that the Sc1-RUNX1(K83N) cell line showed no reduction in fluorescence when transduced with shRNA-expressing lentiviral vector particles targeting the junction point

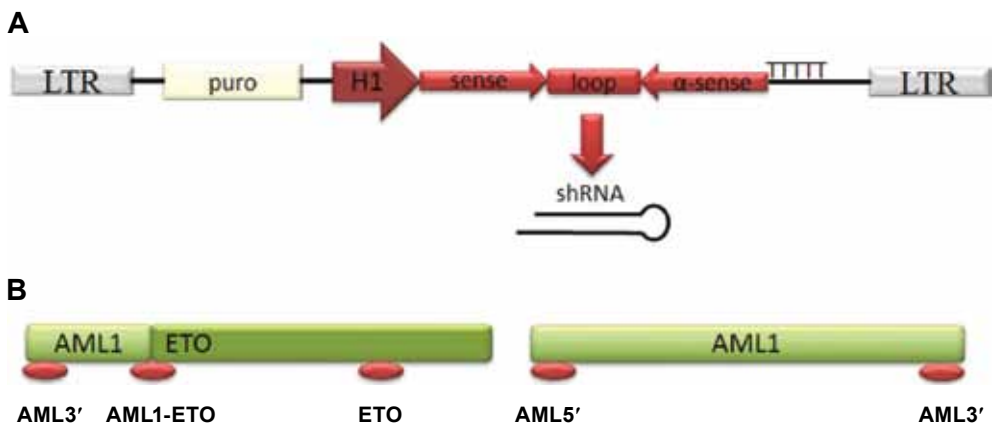


Fig. 5. shRNA expressing lentiviral vectors: *A* – Lentiviral vector expressing shRNA; *B* – siRNA targeting different oncogene zones

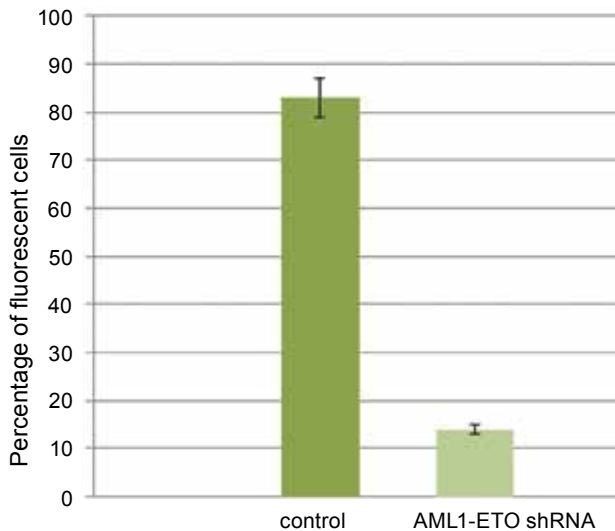


Fig 6. Histogram illustrating the reduction in fluorescence in the AML1-ETO expressing SC-1 murine fibroblast cell line before and after transduction with shRNA-expressing lentiviral vector particles targeting the junction point of the AML1-ETO mRNA

of AML1-ETO mRNA. The results obtained by flow cytometry correlate well with the results obtained by Real Time RT-PCR (Fig. 7).

Our results illustrate the high efficiency of stable synthetically modified siRNA duplexes for silencing the activated oncogenes frequently found in acute myeloid leukemia patients.

Validated siRNA sequences were used to design and synthesize shRNA-coding DNA sequences. The synthesized DNA sequences were cloned into a recombinant lentiviral vector. The shRNA-expressing lentiviral vector particles targeting the junction point of AML1-ETO mRNA and 5'-end of RUNX1 mRNA were used to transduce the oncogene-expressing model cell lines. The transduced model cell lines were analyzed by RT-PCR and flow cytometry. The analysis revealed a significant reduction in the expression of activated oncogenes in the transduced cell lines. This is indicative of the high efficiency of the constructed lentiviral vector constructs, which can be used for silencing target genes by RNA interference.

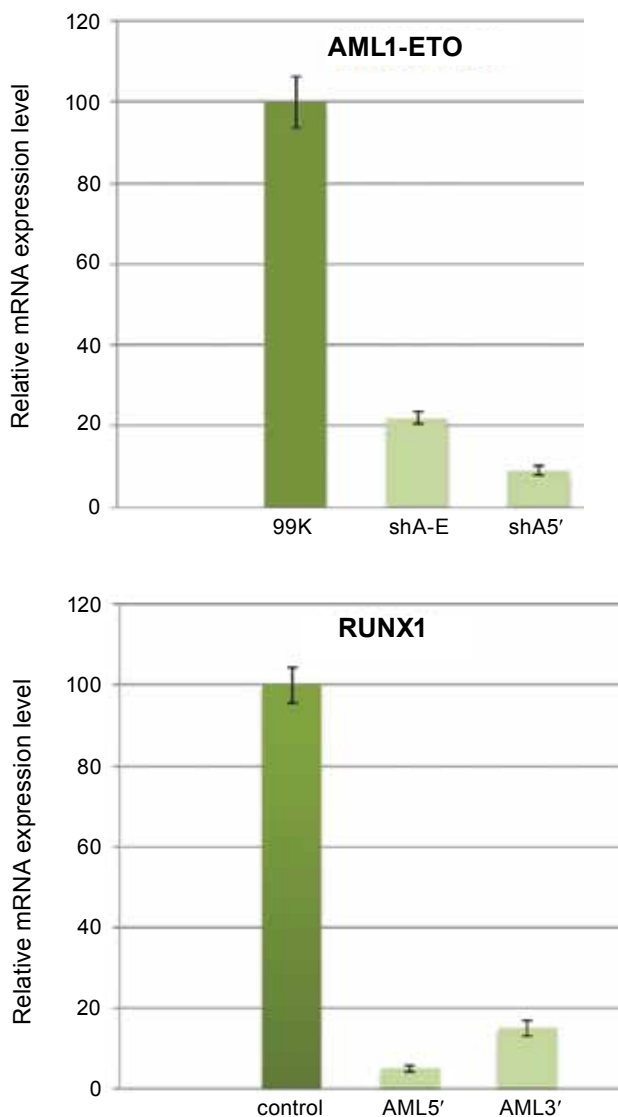


Fig. 7. The Real Time RT-PCR products of total cDNA obtained from RUNX1(K83N) and AML1-ETO oncogene expressing SC1 model cell lines transduced with shRNA expressing lentiviral vector particles: 99K – control (non-transduced RUNX1(K83N) expressing SC1 cell line); shA-E – RUNX1(K83N) expressing SC1 cell line transduced with shRNA expressing lentiviral vector particles targeting the junction point of AML1-ETO mRNA; shA5' – RUNX1(K83N) expressing SC1 cell line transduced with shRNA expressing lentiviral vector particles targeting the 5'-end of RUNX1 mRNA; last three samples - Analysis of AML1-ETO(t8;21) expressing SC1 cell lines (98k – non transduced control, shA-E, sh5' – transduced with corresponding lentiviral vector particles)

This work was supported by the Programms of the Presidium of the Russian Academy of Sciences "Molecular and Cell Biology", "Fundamental Research Basics in Nanotechnology and Nanomaterials", and the Russian Foundation for Basic Research (grant N 11-04-01365-a and N 13-04-00599-a).

References

1. *Vilgelm A. E., Chumakov S. P., Prasolov V. S.* // Mol. Biology. – 2006. – **40**, N 3. – P. 1–18.
2. *Volkov A. A., Kruglova N. S., Meschaninova M. I. et al.* Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect // Oligonucleotides. – 2009. – **19**, N 2. – P. 191–202.
3. *Shuey D. J., McCallus D. E., Giordano T.* RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention // Drug Discov. Today. – 2002. – **7**, N 20. – P. 1040–1046.
4. *Stanislawska J., Olszewski W. L.* RNA interference-significance and applications // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). – 2005. – **53**, N 1. – P. 39–46.
5. *Elbashir S. M., Harborth J., Weber K., Tuschl T.* Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs // Methods. – 2002. – **26**, N 2. – P. 199–213.
6. *Brummelkamp T. R., Bernards R., Agami R.* A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells // Science. – 2002. – **296**, N 5567. – P. 550–553.
7. *Satake N., Maseki N., Kozu T. et al.* Disappearance of AML1-MTG8(ETO) fusion transcript in acute myeloid leukaemia patients with t(8;21) in long-term remission // Br. J. Haematol. – 1995. – **91**, N 4. – P. 892–898.
8. *Peterson L. F., Zhang D. E.* The 8;21 translocation in leukemogenesis // Oncogene. – 2004. – **23**, N 24. – P. 4255–4262.
9. *Kravchenko J. E., Ilyinskaya G. V., Komarov P. G. et al.* Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – **105**, N 17. – P. 6302–6307.

NON-CODING RNAs AND EPIGENOME: DE NOVO DNA METHYLATION, ALLELIC EXCLUSION AND X-INACTIVATION

V. A. HALYTSKIY, S. V. KOMISARENKO

*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: volha@biochem.kiev.ua*

Non-coding RNAs are widespread class of cell RNAs. They participate in many important processes in cells – signaling, posttranscriptional silencing, protein biosynthesis, splicing, maintenance of genome stability, telomere lengthening, X-inactivation. Nevertheless, activity of these RNAs is not restricted to posttranscriptional sphere, but cover also processes that change or maintain the epigenetic information.

Non-coding RNAs can directly bind to the DNA targets and cause their repression through recruitment of DNA methyltransferases as well as chromatin modifying enzymes. Such events constitute molecular mechanism of the RNA-dependent DNA methylation. It is possible, that the RNA-DNA interaction is universal mechanism triggering DNA methylation de novo.

Allelic exclusion can be also based on described mechanism. This phenomenon takes place, when non-coding RNA, which precursor is transcribed from one allele, triggers DNA methylation in all other alleles present in the cell. Note, that miRNA-mediated transcriptional silencing resembles allelic exclusion, because both miRNA gene and genes, which can be targeted by this miRNA, contain elements with the same sequences. It can be assumed that RNA-dependent DNA methylation and allelic exclusion originated with the purpose of counteracting the activity of mobile genetic elements.

Probably, thinning and deregulation of the cellular non-coding RNA pattern allows reactivation of silent mobile genetic elements resulting in genome instability that leads to ageing and carcinogenesis.

In the course of X-inactivation, DNA methylation and subsequent heterochromatinization of X chromosome can be triggered by direct hybridization of 5'-end of large non-coding RNA Xist with DNA targets in remote regions of the X chromosome.

Despite the central dogma of molecular biology, not all cell RNAs are translated into protein sequences. Some of non-coding RNAs – transfer RNAs, ribosomal RNAs, small nuclear RNAs, ribonuclease P – have been studied long ago. However, their involvement in protein biosynthesis machinery did not allow to understand that there is a whole world of RNAs. Recently it was determined that at least 90%

of the genome undergoes active transcription, whereas only 2% encodes proteins [1].

Small non-coding RNAs (usually, less than 200 nt in length) belong to several types and perform, besides translation and splicing, many other important processes in cells:

- microRNAs (miRNAs) – silencing of cell genes involved in proliferation, differentiation and apoptosis;
- short interfering RNAs (siRNAs) – silencing of alien genetic information;
- Piwi-interacting RNAs (piRNAs) and endogenous short interfering RNAs (endo-siRNAs) – maintenance of genome stability via silencing of mobile genetic elements in germline and early embryogenesis;
- X-inactivation linked RNAs (xiRNAs) – X-inactivation [2];
- promoter-associated RNAs (paRNAs), also known as transcription start site-associated RNAs (TSSaRNAs) and as transcription initiation RNAs (tiRNAs) – transcriptional regulation of downstream genes [3], maintaining accessible chromatin architecture [4];
- enhancer RNAs (eRNAs) – probably, transcription activation [3];
- circular RNAs (circRNAs) – probably, miRNA sequestration [5].

Also, a group of small non-coding RNAs includes centromere repeat associated small interacting RNAs (crasiRNAs), telomere-specific small RNAs (tel-sRNAs) and pyknons; their functions remain unclear [1].

A group of long non-coding RNAs (lncRNAs) consists of long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs), long intronic non-coding RNAs, telomere-associated non-coding RNAs (TERRAs), long non-coding RNAs with dual functions, pseudogene RNAs and transcribed-ultraconserved regions (T-UCRs) [1]. lncRNAs participate in the regulation of embryo development, imprinting, allelic exclusion, recruitment of transcription factors and modulation of their activity. Some of lncRNAs – Xist RNA and Tsix RNA – are involved in X-inactivation [2]. Another important lncRNA – telomerase RNA component (TERC) – serves as template for reverse transcription of telomeric repeats. Sometimes, lncRNAs can be processed into small non-coding RNAs involving in usual RNA interference.

Non-coding RNAs are often associated with diseases [6]. So, tumor growth is tightly intertwined with regular shifts in miRNA expression pattern. More than 50% of miRNA genes are located in fragile chromosomal regions that undergo the amplification, translocation and other damages during the carcinogenesis. Shifts in miRNA pattern facilitate proliferation and surviving [7], impair cytoskeleton and adhesion as well as increase motility of the cancer cells [8]. Also, lncRNA deregulation and abnormal expression is described in some tumors [1].

Because listed non-coding RNAs are involved in the regulation of genetic information expression, the aim of present research is to identify in what ways non-coding RNAs can perform such functions, in particular, how these RNAs affect the cellular epigenetic information (epigenome). As some non-coding RNAs are able to cause gene repression at transcription level, there should be a common pathway for the initiation of epigenetic changes by non-coding RNA.

Interfering RNAs and RNA-dependent DNA methylation

siRNAs were discovered as molecules mediating RNA interference triggered by double-stranded RNA (dsRNA). dsRNA is recognized and cleaved by endoribonuclease III Dicer into fragments of about 22 nucleotides in length [9]. These fragments enter the RISC [10, 11], where dsRNA is untwisted with aid of Argonaute protein, and one strand of dsRNA remains bound to this protein. This monochain oligonucleotide (aptamer) is the siRNA. After binding to complementary sites on RNA, siRNAs initiate their degradation; as a result, the gene expression is interrupted at the posttranscriptional stage.

Biogenesis of miRNAs, which can also trigger gene silencing, is like. Most miRNAs are transcribed from their own genes that contain gene promoter and regulatory units. However, as much as 40% miRNAs are originated from introns of protein coding genes, whereas approximately 10% – from lncRNA introns [12]. miRNA sequences are synthesized as over 1 kb long primary transcripts (pri-miRNAs). pri-miRNAs form imperfect hairpins which are processed by the nuclear ribonuclease III Drosha into double-stranded pre-miRNAs, about 60 b.p. in length [13]. Pre-miRNAs enter the cytoplasm due to active transport with participation of exportin 5 [14] and subsequently are processed, like siRNA, by ribonuclease Dicer [15]. Then mature miRNAs can silence gene expression at the posttranscriptional level – expression of 60% genes in the human genome can be regulated by miRNAs [16]. The total number of miRNA genes might be closer to a thousand and thus potentially constitutes about 3% of the genome [17].

Nevertheless, siRNAs can initiate gene silencing not only at posttranscriptional but also at transcriptional level. It has been shown that artificial siRNA against CG-containing promoters causes in human cells methylation of DNA and K9 residue of histone H3 *de novo* [18]. This process is dependent on the simultaneous presence of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3b, but not DNMT2. Assuming this background, we had attempted to define the link between interfering RNAs and epigenome.

Concentration of C(N)G sites in siRNAs and miRNAs. As is known, in the course of evolution the majority of cytidylate residues in CG dinucleo-

tides are lost due to the deamination of 5-methylcytosine to thymine. At present, for instance, frequency of CG dinucleotide in human or mouse genome amounts to 1%, while in rat genome – 1.2% [19, 20]. These levels are more than 4 times lower than expected CG frequency in the random DNA sequence (e.g., since the human genome contains 42% G-C pairs, frequency of CG dinucleotide should be equal to $0.21 \cdot 0.21 = 4.41\%$).

Nevertheless, we found *in silico* that the concentration of CG dinucleotide amounts to 2.85% in siRNA sequences and to $2.58 \pm 0.17\%$ in mature miRNA sequences [21–23]. It was quite intriguing that the concentration of CG sites in miRNAs and siRNAs significantly exceeds the general genome level.

The frequency of CNG trinucleotides (here N designates any nucleotide) amounts to 6.29% in siRNA sequences and to $5.77 \pm 0.25\%$ in mature miRNA sequences [21–23], although the average frequency of CNG trinucleotide in human genome should be equal to $0.21 \cdot (0.21 + 0.21 + 0.29 + 0.29) \cdot 0.21 = 4.41\%$, where 0.21 – level of cytosine as well as guanine, 0.29 – level of adenine as well as thymine. Thus, CNG trinucleotide was also found significantly more often in siRNA and miRNA sequences than in the random genome sequence.

It is also very significant that only 15.69% siRNA sequences and 20.01% mature miRNA sequences contain none of CG or CNG sites [23, 24].

Localization of C(N)G sites in siRNAs and miRNAs. Also, siRNA and miRNA sequences have been examined in order to discovery of localization pattern of CG dinucleotides and CNG trinucleotides in miRNA sequences. As a result, certain regularities have been found in this pattern.

Although the frequency of CG sites exceeds the average genomic level along whole siRNA sequence, peaks of their concentration are found close to the nucleotides 4, 11 and 16 from 5'-end. CNG sites are congregated around the nucleotides 4 and 13 [25].

In miRNAs, one of the greatest peaks of CG site concentration is located close to the nucleotide 10 from 5'-end [23]. The level of CG sites exceeds in this peak more than four the average genomic frequency of this dinucleotide. Other evolutionary conservative peaks are located around the nucleotides 16 and 21 in miRNA sequence. Peaks of CNG site concentration correspond with nucleotides 4 and 8 [23].

Approximately half of miRNA sequences contain two or more C(N)G sites. The distance between these sites amounts mostly to 1 or 3-9 nucleotides [23].

So, the peaks of C(N)G sites concentration are located not only within seed region, but also along the full length of miRNA sequence.

Nevertheless, these sites are disposed in the same miRNA molecule mainly within one turn of double helix.

Interfering RNAs as pointers of RNA-dependent DNA methylation. Above described investigations indicate that CG dinucleotide in siRNAs and miRNAs is present more often than it should be found in random sequence. CG sites are found in about half of the siRNAs and miRNAs molecules. Overwhelming majority of siRNAs and miRNAs contain also CNG trinucleotide that is also present more often than in random sequence. At the same time, only one fifth part of miRNA sequences and less than one sixth part of siRNA sequences contains none of CG and CNG sites. This indicates that CG dinucleotides and CNG trinucleotides in interfering RNAs should have essential biological role.

On this basis, we had proposed that siRNAs and miRNAs should directly scan the DNA strands unwinding during transcription (this explains dependence of RNA-mediated transcriptional silencing on functioning of RNA polymerase) [21, 22, 24]. Most likely, interfering RNAs interact with the nontemplate (coding) DNA strand. Therefore, siRNAs and miRNAs are also complementary to sequence of RNA transcript and can hybridize with it in the course of usual posttranscriptional silencing.

On encounter of complementary DNA site, siRNA or miRNA should bind to it directly (Fig. 1). This should involve the cellular DNA methyltransferases in cytosine methylation *de novo* in CG dinucleotides and CNG trinucleotides, which are bound to complementary sites in the interfering RNA (Fig. 1) [22]. The maintenance methyltransferase DNMT1 can methylate the complementary DNA strand (template) already after the removal of interfering RNA from RNA-DNA duplex and renewal of the double-stranded DNA structure. It is also possible that these events involve histone deacetylases and histone methylases that remove active chromatin marks and, respectively, apply marks of silenced chromatin; however, more likely, the components of chromatin remodeling complexes are recruited indirectly because of recognition of the methylated DNA (Fig. 1) [24]. C(N)G site localization pattern (see above) can be evidence of participation of whole miRNA or siRNA sequence in proposed mechanism of RNA-dependent DNA methylation [23].

At first sight, suggested mechanism can lead only to methylation of sites which DNA is unwinding by RNA polymerase, i.e., within the transcribed DNA. If so, how are methylated the regulatory elements in non-transcribed DNA regions? This collision can be solved by assumption that the epigenetic marks are able to be spread throughout the entire DNA domain – in particular, because processes of histone deacetylation and methylation can target not only the nucleosomes connected directly with the methylated DNA sites, but also the adjacent ones (Fig. 1). Then

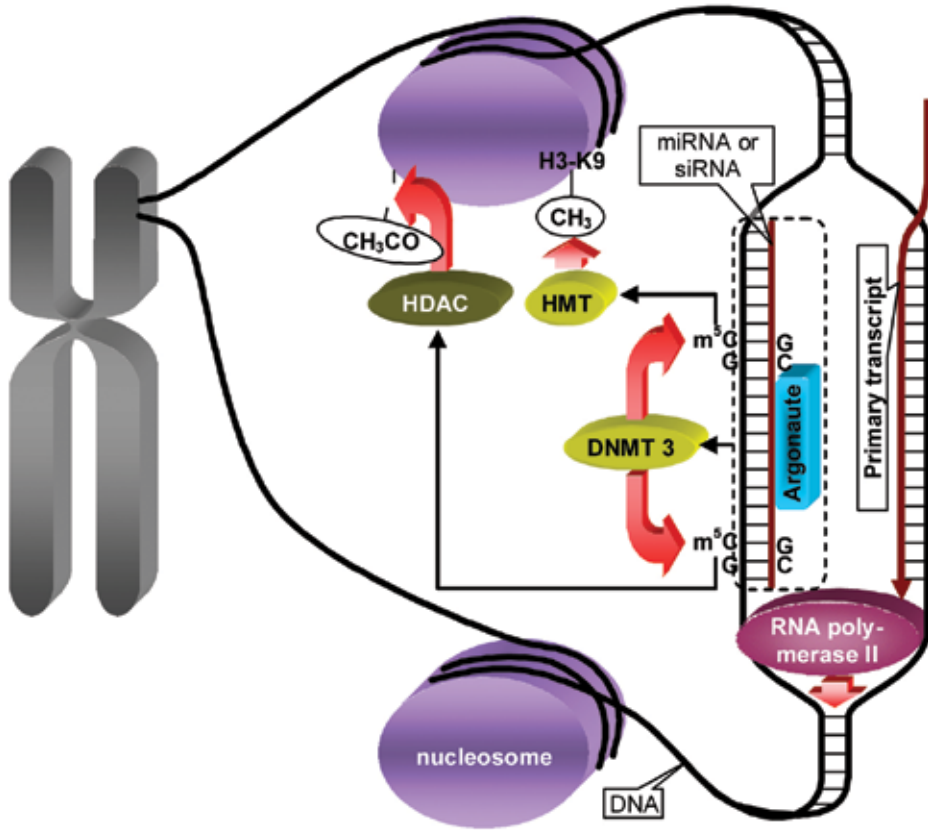


Fig. 1. Initiation of DNA methylation *de novo* by interfering RNAs

the DNA methyltransferases recognize methylated histones and thereafter methylate DNA associated with them; this leads again to deacetylation and methylation of histones in adjacent nucleosomes and so on [24].

As a result of these events, the gene recognized by siRNA or miRNA is redirected to heterochromatin and becomes steadily inactivated. In addition, if the recognized motif is present in several genes, all of them can be repressed simultaneously [24].

Recently research confirms that non-coding RNAs can directly hybridize with DNA, causing involvement of the *de novo* DNA methyltransferase DNMT3B [26]. Small non-coding RNAs can bind to target DNA sequences, forming of RNA:DNA heteroduplexes or RNA:DNA:DNA triplexes; in addition, lncRNAs can recognize specific features of the chromatin surface. These events should cause involvement of the chromatin modifying complexes [27].

We had also suggested that the RNA-induced transcriptional silencing complex (RITS), which is discovered in some organisms [28, 29], is assembled already after the events described above. RITS function is to initiate cleavage of RNA transcript of the gene targeted by siRNA molecule. Probably, the first element, which should bind with the siRNA-Argonaute complex (already after hybridization siRNA with complementary DNA sequence and methylation of DNA and histone H3), is the chromodomain-containing protein Chp1 (Fig. 2) [24]. Protein Tas3 joins the complex after (since Tas3 is able to bind RNA [30], it is likely, that the key role of this protein is the search of the RNA transcript which synthesis entails the recognition of the gene sequence by siRNA). Here the RITS assembling is completed, after which it binds RNA-directed RNA polymerase (RdRP) and aims it to dsRNA synthesis on the transcript that still is bound to RNA polymerase. Thus, initiation of degradation of the primary transcript (and the rest of RNA molecules which had been transcribed earlier from this gene) requires, first, recognition of the complementary DNA motif by siRNA and, second, interaction of the Chp1 protein chromodomain with methyl mark on the residue K9 of histone H3. This should prevent unauthorized degradation of the transcript [24].

This sequence of RITS complex assembly and function predicts that siRNAs and miRNAs, which contain none of CG dinucleotides or CNG trinucleotides, should be involved only in the usual posttranscriptional silencing.

Molecular basis of allelic exclusion. Explanation of molecular mechanism of allelic exclusion as well as other phenomena with the gene dosage effect represents a very complicated problem. Not all genes undergo the allelic exclusion, but even if it is characteristic of certain gene, allelic exclusion will be constantly maintained in spite of largest fluctuations of gene expression level and regulatory influences. Regardless of the number of alleles, no more and no less than one of them will remain active in the cell as a result of the allelic exclusion.

Nevertheless, the molecular mechanism of allelic exclusion should be surprisingly simple when supposing that the non-template DNA strand can be also transcribed and its transcript encodes precursor of miRNA, which mature form can subsequently target this DNA strand [24, 31]. Bi-directional transcription is found, at least sometimes, in genes undergoing allelic exclusion.

Probably, the concentration of miRNA transcribed from only one allele is in all cases insufficient to overcome the threshold of initiation of the above-proposed process of RNA-dependent DNA methylation leading to the repression of this allele *de novo*. The presence of such threshold is expected, because RNA polymerase movement along transcribing DNA

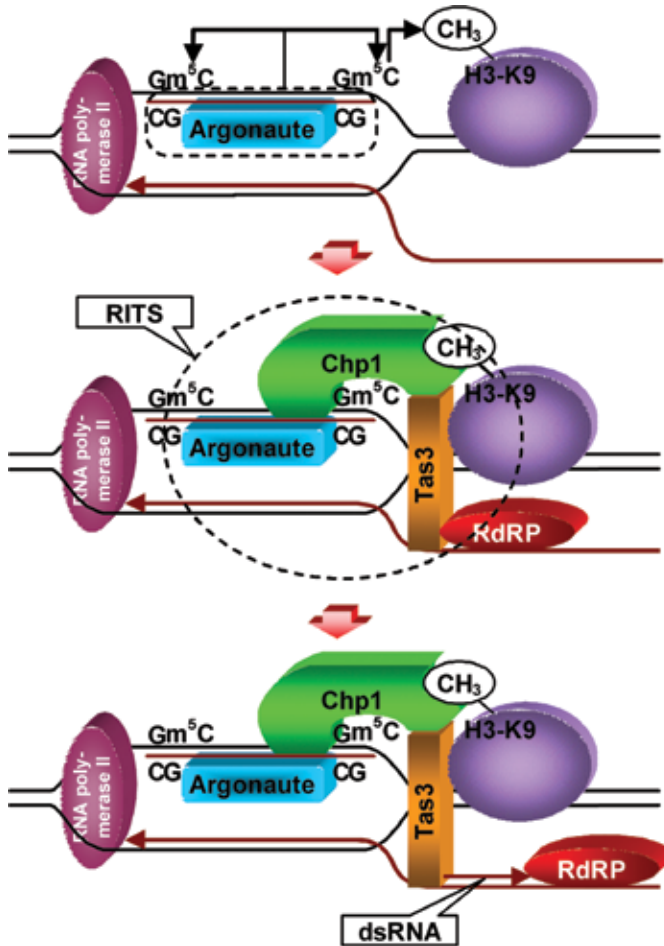


Fig. 2. Assembling of the RITS complex

strand should release it from the bound miRNAs (possibly, such removal or cleavage of miRNA should occur with certain delay, as the miRNA-DNA hybrid is somewhat more stable than double-stranded DNA) [24]. Thereat, miRNAs have no time to initiate the epigenetic modifications.

If more than one allele are active in cell for some reason, miRNA concentration overcomes the above mentioned threshold sooner or later. In this case, RNA polymerase has no time to remove miRNAs before they trigger the DNA methylation and further remodeling of chromatin within bound targets (Fig. 3). As a result, both strands of DNA in the marked allele undergo the repression, whereas the other allele remains active. These events constitute the molecular mechanism of allelic exclusion [24].

It is also to be noted that the miRNA gene transcript during its own synthesis could not induce the DNA methylation itself, because the pri-miRNA aspires to fold in hairpin configuration leading to fast break of its connection with the transcribed DNA chain (Fig. 3).

Obviously, the repression process targets the allele that, all other things being equal, is less actively released from the bound miRNAs, i.e., is weaker transcribed from the DNA strand which transcript is the miRNA precursor (for instance, due to some peculiarities of its chromatin or adjacent chromosome regions). It can also suggest that the repression-initiated threshold of miRNA concentration is not standard value for each of alleles, but is flexibly tuned. The more active is transcription and, consequently, separation of the miRNAs from DNA targets, the higher is this threshold (Fig. 3). An important consequence of this is that if the second allele begins its expression in the cell, the repression-determining threshold of miRNA concentration for this allele can become significantly lower than for the already completely active allele. In the extreme case, concentration of the miRNA transcribed from the active allele, being subthreshold one for repression of this allele itself, at the same time turns out to be already superthreshold for the alleles beginning the expression, which leads to their silencing. On the other hand, owing to the tunable threshold, the allelic exclusion can be established at the very different levels of expression of the involved genes [24].

It can be expected that the non-random pattern of exclusion of some paternal and maternal alleles in interspecies hybrids is certainly associated with the initially determined inequality of their expression levels, for instance due to differences in nucleotide sequences of the allele regulatory elements of genes belonging to different species.

In the other extreme case, if all alleles are approximately equally active and accordingly can begin simultaneously the labeling with the repressive chromatin marks, the functioning of alleles will be affected by counteraction of stimuli activating gene expression (these stimuli are able to recruit the chromatin remodeling complexes that remove markers of the silent chromatin) and of RNA-dependent DNA methylation triggered due to accumulation of miRNAs. Under these conditions the miRNA concentration evidently should aspire to reach the value near the threshold for the present transcription intensity; but since this state is unsteady or unachievable, the random fluctuations at application and removal of epigenetic marks can determine in the end, which of the alleles will undergo the repression, and which will remain active [24].

The palindromic structure of miRNA precursors reveal that the genes originate from mobile genetic elements [32]. It is likely that the mechanisms that mediate the allelic exclusion and other gene dosage effect ap-

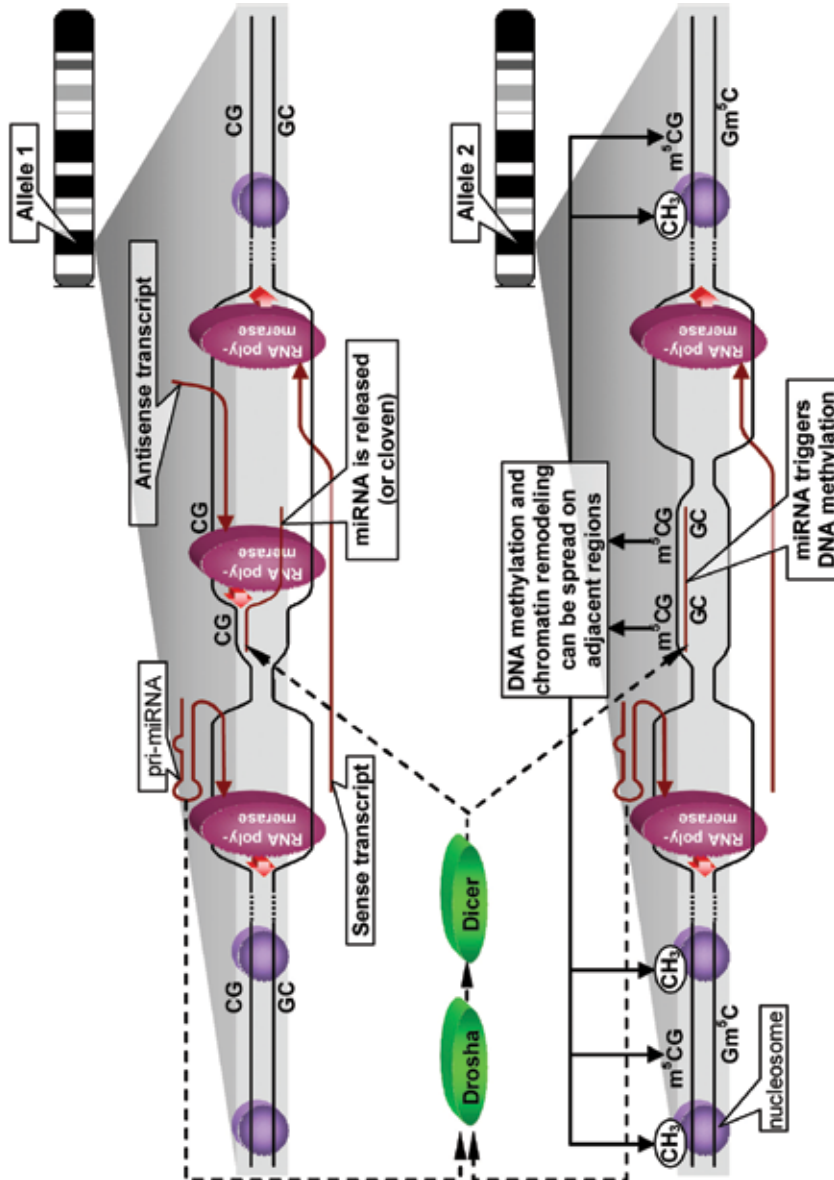


Fig. 3. Mechanism of allelic exclusion: allele 2 undergo the repression, allele 1 remains active

peared in the evolution exactly with the purpose of transcriptional repression of transposons. Probably, the cells had allowed expression of only one copy of transposable element, transcript of which was used for recognition of all other copies of this element and for involving of the DNA methyltransferases and chromatin remodeling complexes in repression of these copies [24].

Recent studies confirm the involvement of RNA interference in transposon repression – transcripts of *LINE1* retrotransposons (see below), being double-stranded, can be processed into siRNAs by endonuclease III DICER; moreover, the presence of these siRNAs suppresses retrotransposons activity as well as causes degradation of *LINE1* transcripts, i.e. posttranscriptional silencing [33]. It is also shown that retrotransposons are reactivated in the lack of DNA methyltransferases, particularly, Dnmt3L that is involved in the *de novo* DNA methylation [34] or Dnmt1 that is responsible for maintenance of DNA methylation pattern [35].

As a result, the cells with the aid of interfering RNAs suppress functioning of transposons, maintain the cell genome stability and counteract the horizontal gene transfer. Also, this mechanism protects the cells from consequences of the excessive copying of some genes, caused by mobile genetic elements. The similar mechanisms using siRNAs prevent also the multiplication of the alien genetic information invading the cell. siRNAs silence this information or, if it is represented only as RNA, trigger its total cleavage. Sometimes, these mechanisms target the genes transferred purposefully into cells with the aid of biotechnological manipulations.

miRNA-directed allelic exclusion in immunoglobulin gene loci. It has been suggested that miRNAs can cause allelic exclusion in the immunoglobulin gene loci in the same way [36]. *In silico* search in miRNA database miRBase shows that genes of four human miRNAs – miR-4539, miR-4507, miR-4538, miR-4537 – are clustered within immunoglobulin heavy chain locus (IGH@) of chromosome 14, position 106325653-106323741 [37]. This cluster is located in a spacer between sequences encoding last J-fragment and first exon of C μ -fragment on the same strand (negative). Also, miRNA candidate sequence AB019440.1 is transcribed from positive strand in V-fragments region of IGH@.

The gene of another human miRNA, miR-650, is found within immunoglobulin lambda chain locus (IGL@) on positive strand of chromosome 22, position 23165270-23165365. This gene overlaps exon 1 of IGLV2-8-001 gene and intron 1 of the gene encoding lincRNA D87024.2. Six miRNA candidate sequences – snoU13.380, D86994.2, D86994.1, D87015.1, D86998.1 and D87024.1 – are also transcribed from sequences located in IGL@ [37].

Therefore, localization of miRNAs genes in immunoglobulin gene loci corresponds with the predictions from hypothesis of miRNA-directed allelic exclusion. Furthermore, each mature sequence of miR-650, miR-4539, miR-4507, miR-4538 and miR-4537 contains 2-4 C(N)G sites. Also, exons of listed miRNA candidate sequences contain several C(N)G sites [37]. These facts confirm that miRNAs can cause allelic exclusion through the methylation of complementary DNA sequences.

Loss of interfering RNAs allows transposon reactivation, ageing and carcinogenesis. Significant part of eukaryotic DNA consists of transposons – the nucleotide sequences that can change their localization within the genome. Part of transposons in the human genome is 45% [38], which corresponds to 3-4 million copies. There are two basic classes of transposons: DNA-transposons, which accounts for 3% of nuclear DNA, and retroelements. Retroelements, in their turn, are subdivided into 3 sub-classes: long interspersed nuclear elements (*LINEs*), short interspersed nuclear elements (*SINEs*) and retrovirus-like elements with long terminal repeats (*LTRs*). The latter also include endogenous retroviruses [39]. *LINEs* occupy 21% of nuclear DNA, and *SINEs* and *LTRs* occupy 13% and 8%, respectively. The most common among transposons of *LINE* class are *LINE1* retrotransposons, and among *SINEs* – *Alu* sequences (1 million copies per genome). Most of transposons in genome were damaged in the course of evolution, nevertheless, some defective transposons can transpose at present, using proteins encoded by remaining viable transposons [40].

Transposons play an important role in the evolution, since they can move DNA fragments that contain coding and regulatory sequences within the genome and even between genomes of different species, which results in assembling of new genes and in the rearrangement of sites that regulate their expression. Probably, transposon activity has led to the formation of linear chromosomes, and telomeres are reduced transposon sequences. This assumption is supported by observation that, at least sometimes, retrotransposons assume telomere function [41]. Addition of new telomeric repeats with the use of transposed RNA-template as well as telomerase that is a reverse transcriptase still resembles some stages of retrovirus replication; considerable similarity was found between sequences of retrotransposon reverse transcriptase and telomerase reverse transcriptase – TERT-subunit of telomerase [42].

However, at the level of individual cells and organisms, transposons are primarily the genomic parasites that pose a serious threat as they can cause both the genome destabilization through mass lesions [34] and single mutations, including mutations that provoke tumor growth and other diseases [43–46]. In particular, in chronic myeloid leukaemia *Alu* elements cause the reciprocal translocation of cell proto-oncogene *c-abl* under con-

trol of B-cell receptor gene promoter, outwardly manifested in Philadelphia chromosome appearance [47]. It is also evidenced that some endogenous retroviruses are still active [48, 49].

Twenty years ago, Murray had proposed that with time the number of transposons increases exponentially and they can kill a cell line or organism because of inactivation of essential cell gene through insertion of transposon sequences into this gene [50]. Although there is no such gene, we think that other aspects of this hypothesis mirror correctly the molecular mechanism of ageing.

Expression of transposons can be suppressed through methylation of their DNA [51] as well as through influence of interfering RNAs, in particular miRNAs [52]. Above it was shown how the interfering RNAs can induce methylation of transposon DNA in proposed process of RNA-dependent DNA methylation.

Recent studies have shown that transposons are suppressed in germline and some somatic cells by two other classes of interfering RNAs: piRNAs [53] and endo-siRNAs that are generated in the course of processing of double-stranded transcripts in early embryogenesis [54, 55]. It seems plausible that both piRNAs and endo-siRNAs come from the same RNA sequences that form double-stranded regions which are processed by different enzyme systems. Although it is not yet entirely clear why some cells produce piRNAs, and other ones produce endo-siRNAs, the global strategy of cells is understandable. Since transposons usually contain the bidirectional transcribed genes, and recombination of some classes of transposons requires the inverted repeats, transposon transcripts should form double-stranded regions. So, it is quite necessary for the cell to suppress as far as possible the expression of all DNA sequences producing transcripts that contain such regions.

It is believed that cells can involve all interfering RNAs, including piRNAs and endo-siRNAs, in the above proposed mechanism of RNA-dependent DNA methylation.

At the next stages of embryo development, piRNAs and endo-siRNAs disappear because they should initiate repression of the sequences from which precursors of these piRNAs and endo-siRNAs were transcribed. This allows the expression of the silenced genes, if they are activated legitimately in response to specific signals. At the same time, in principle, silencing of transposons must be kept over cell generations both by maintaining DNA methylation and by reciprocal renewal of repressive marks on DNA and histones.

However, a gradual decrease in the DNA methylation level is observed with age [56], and this means that over time the cells slowly lose repressive chromatin marks. Probably, this occurs because the accuracy of mainte-

nance of DNA methylation is not absolute although it is no less than 99% [57]. Assuming that the accuracy of this process is 99%, it can be estimated that only $0.99^{50} \approx 0.605 \approx 61\%$ of the initial amount of methyl marks will remain in DNA after 50 cell generations.

We supposed that miRNAs expressed in the cells can subject the sequences, initially repressed by piRNA and endo-siRNA, to transcriptional and posttranscriptional silencing again [58]. However, it is still difficult to judge how well cell miRNAs can override the spectrum of diversity of these sequences. It is only known that miRNAs are able to repress on posttranscriptional level at least 60% of cell genes [16].

miRNAs often silence the stage-specific genes responsible for normal course of the cell differentiation [59]. Therefore, cell differentiation, starting with the early stages, requires repression of some miRNA genes, otherwise these miRNAs would prevent expression of stage-specific genes. On this basis, it has been suggested that, at some instant, the maturing cells must lose the ability to renew repressive marks on the sequences of some transposons, if these marks are completely erased for any reason [58]. Moreover, it is also possible that this take place not only in maturing but in all other body cells, including stem cells, because the production of piRNAs and endo-siRNAs is terminated earlier than the cells begin the differentiation that requires repression of miRNA genes.

Anyway, DNA demethylation, which can occur either spontaneously or in the course of repair of methylated DNA, or due to direct activation of gene expression caused by binding of stage-specific transcriptional factors, makes possible reactivation of some transposons in the cells which have lost interfering RNA that recognize sequences of these transposons. This should lead to dramatic increase of DNA damage level. Activated in response, the DNA repair systems, in particular, BRCA1-dependent mechanisms based on homologous recombination should cause not only the DNA recovery, but also illegitimate recombination in telomere caps, which leads to the conversion of T-loops into T-circles (telomeric caps represent ready pre-recombination Holliday junctions) – see Fig. 4 [58]. It predetermines the accelerated erosion of telomeres that are most accessible to the recombinases (this explains the unequal erosion of different telomeres in the cell) and, finally, apoptosis. In the case of severe DNA damage the cells may undergo apoptosis before the critical telomere erosion occurs. With age the increasing number of cells must reach a threshold of reactivation of dormant transposons; subsequent apoptosis of the majority of these cells leads to the ageing of the organism [58]. In addition, genome destabilization can cause not only apoptosis, but also tumor transformation of cells; thereby, transposon derepression determines the correlation between ageing and cancer appearance [60].

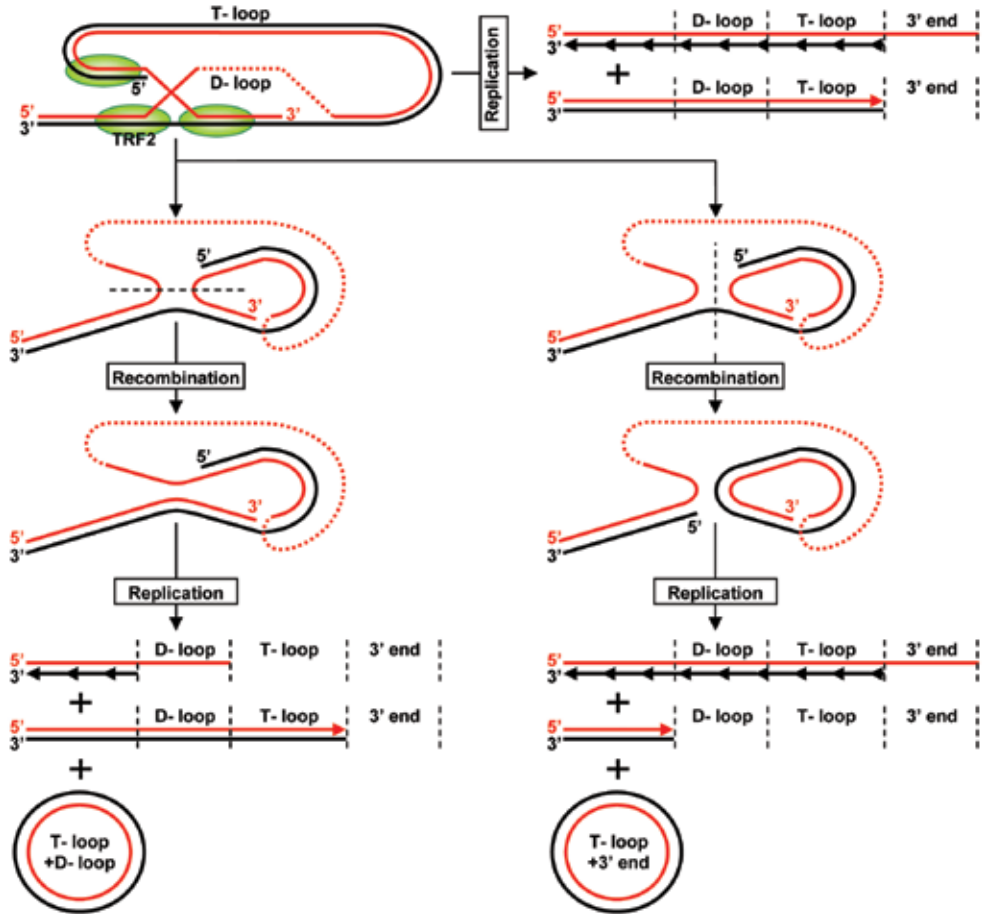


Fig. 4. Telomere and recombinational loss of telomeric DNA

Species with higher genome stability possess greater life span and lower cancer risk because their cells reach the threshold of dormant transposon reactivation later than cells of species with low genome stability. This mirrors in amount of transposon-mediated mutations – in particular, the estimated frequency of retrotranspositions in mice is more than 60-fold greater than in humans [61]. Nevertheless, species with higher genome stability require steady ecological niche because their variability is low.

miRNA-mediated indirect impact on DNA methylation and chromatin remodeling. Recently, we found *in silico* that miRNA can also indirectly influence epigenome through posttranscriptional silencing of genes encoding the *de novo* DNA methyltransferases, histone modifying enzymes as well as components of chromatin remodeling complexes. In particular,

miRNAs, hyperexpression of which is essential for abnormal proliferation and surviving of cancer cells (miR-18a/b, miR-19, miR-21, miR-29a, miR-155, miR-181, miR-206, miR-210 and miR-221/222), can silence genes encoding histone deacetylases HDAC1/2/4/6/7/8/9 and SIRT1/3/5/7. Also, these miRNAs can silence *ASH1L*, *DOT1L*, *EHMT1/2*, *EZH1*, *MLL*, *MLL2/3/5*, *NSD1*, *PRDM2*, *SET*, *SETBP1*, *SETD1A/B*, *SETD2/3/5/6/7/8*, *SETDB1/2*, *SMYD1/2/4/5*, *SUV39H1/2* and *SUV420H1/2* genes encoding histone methyltransferases. Other targets of some of these miRNAs are genes encoding *de novo* DNA methyltransferases DNMT3A, DNMT3B and DNMT3L.

Down-regulation of other miRNAs (miR-16, miR-122, miR-31, miR-143, miR-145 and miR-320) allows overexpression of genes encoding histone acetyltransferases PCAF, Elp3, ATF2, MOZ, MORF, HBO1 and TIP60. Also, this down-regulation can lead to higher expression of *KDM1A/B*, *KDM2/B*, *KDM3A*, *KDM4A/B/C* and *KDM5A/C/D* genes encoding histone demethylases as well as of *ARID1A/B*, *SMARCC2*, *SMARCD1/2* and *ACTL6A* genes coding components of SWI/SNF chromatin remodeling complex.

This causes an increase of overall level of chromatin acetylation and expression and, therefore, makes possible the reactivation of silent oncogenes and transposons, which can rapidly lead to DNA damage and genome destabilization. Such shifts should underlie the initial stage of carcinogenesis.

Other mechanisms of influence of non-coding RNAs on the epigenome. The great length of lncRNAs makes possible the presence of domains with different functions. lncRNAs can recognize specific DNA motifs and simultaneously recruit proteins – e.g., histone modifying enzymes or transcription factors, aiming them to the DNA targets and causing chromatin remodeling. Also, lncRNAs can serve as scaffolds for assembling of multimolecular complexes binding heterochromatin proteins, e.g., in case of pericentric heterochromatin formation. In addition, lncRNAs can transmit changes of global chromosomal configuration into chromatin modification and vice versa [62, 63].

lncRNAs can sequester miRNAs, weakening the miRNA-mediated posttranscriptional silencing of true targets [62]. In addition, non-coding RNAs can protect some transcripts by masking the miRNA binding sites [63].

X chromosome and *cis*-interacting non-coding RNAs

Number of X chromosomes is different in XX and XY individuals and can increase several times in case of X aneuploidy. Dosage compensation of X-linked genes is achieved due to the X chromosome inactivation, which

takes place at early development stages in all cells containing more than one X chromosome. X inactivation leads to repression of most genes in all except one of the X chromosomes in cell. After establishment, inactive state of X chromosome is stably inherited by all next cell generations (excepting germline cells that reactivate own X chromosome).

X inactivation depends on two partially overlapping genes on the X chromosome, *Xist* and *Tsix*, that encode lncRNAs acting in *cis* [2]. *Xist* RNA coats the same X chromosome, from which it is transcribed, and triggers silencing of this chromosome. In contrast, *Tsix* RNA is transcribed from active X chromosome and, being antisense to *Xist* transcript, counteracts its activity, also in *cis*. The key pluripotency transcription factors Nanog, Oct4 and Sox2 can be bound to *Xist* intron 1, resulting in restriction of the *Xist* expression in undifferentiated embryonic stem cells [64].

Recently investigations shown, that *Xist* and *Tsix* transcripts can be processed into xiRNAs – small RNAs that are 24-42 nt in length [2].

Molecular basis of X-inactivation. Our recent studies have shown that large non-coding RNA *Xist* can predetermine the X-inactivation through the RNA-dependent DNA methylation [65].

Although the concentration of CG and CNG sites in *Xist* averages 0.8%, that is even less than the general genome level (1%), the localization of these sites reveals extreme irregularity. Of particular interest are: 1) area that includes the first 2000 nucleotides from 5'-end of the *Xist* RNA (within its first exon) and 2) small A region within this area between nucleotides 350 and 770 from 5'-end, where CG concentration exceeds the average level several times, reaching 3% and 5%, respectively. Also, CNG concentration reaches maximum density in this area and in the A region (5.7% and 7.6%, respectively).

In addition, both the X chromosome and the other chromosomes contain numerous sites that are homologous to the sequences of the above-mentioned area of *Xist*.

These data support the hypothesis that the 5'-end sequences of the *Xist* RNA directly bind with complementary DNA of other genes, triggering the RNA-dependent DNA methylation [65]. The interaction between *Xist* RNA and target sequences should begin already during synthesis of the *Xist* transcript, before its separation from RNA polymerase, otherwise free *Xist* RNA undergoes folding and rapid cleavage (Fig. 5) [65]. This explains, how *Xist* causes the X-inactivation only in *cis*, as well as why inactive X chromosome is coated with *Xist* transcript. The fact, that not all genes contain sequences complementary to the *Xist* RNA, explains how these genes keep activity in the inactivated X chromosome.

On the active X chromosome, *Tsix* RNA causes *Xist* repression due to involving of the DNA methyltransferases that methylate the *Xist* promoter.

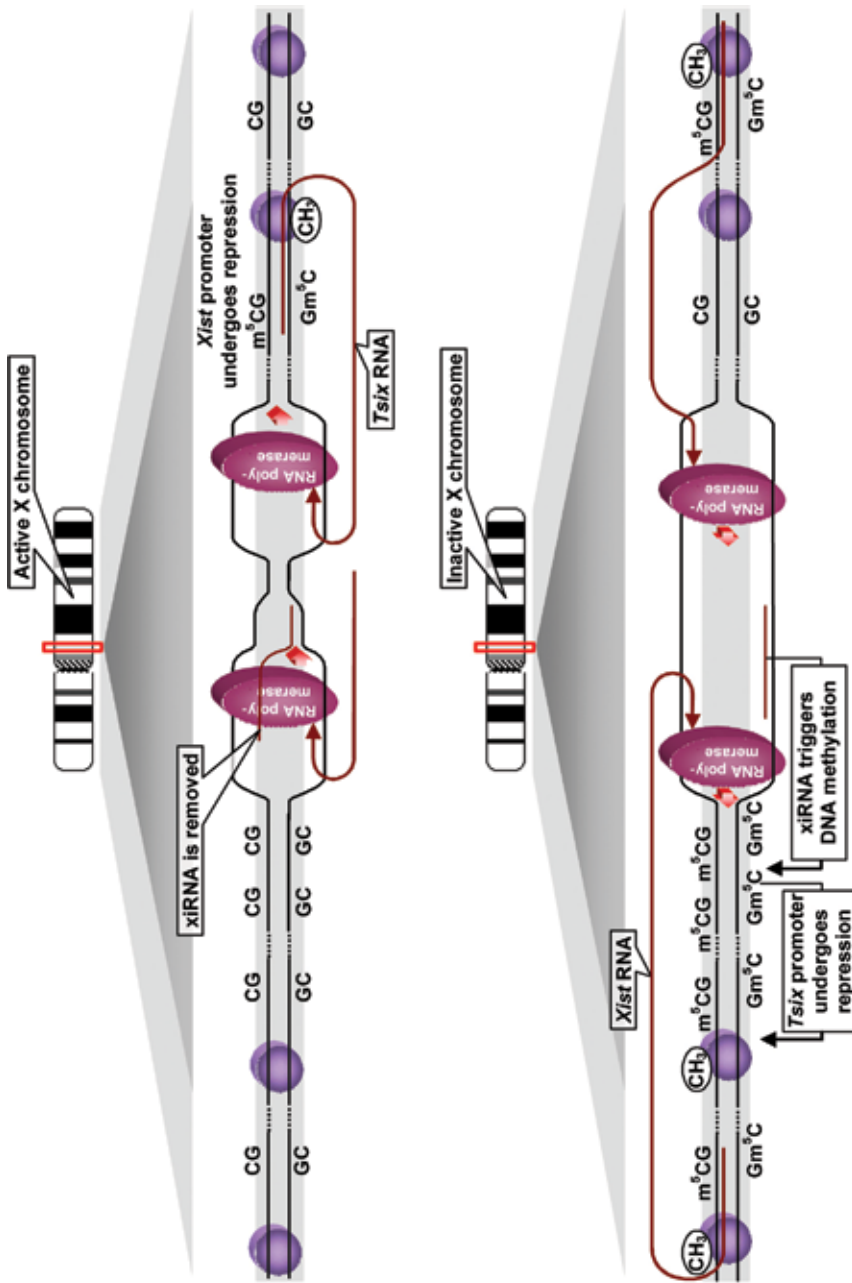


Fig. 5. Mechanism of X-inactivation

It is shown, that this *Tsix*-mediated silencing of *Xist* and other steps in the X inactivation process are independent of the RNA interference mechanism [66]. Therefore, it seems that *Tsix* RNA triggers *Xist* repression again through the *cis*-interaction with DNA target, which initiates the RNA-dependent DNA methylation. This interaction should occur before *Tsix* transcript separation from RNA polymerase.

Because only one X chromosome remains active in cell, X-inactivation requires *Xist* expression from all alleles except one. Note that this situation is the opposite of the allelic exclusion. Therefore, allelic exclusion must touch *Xist* repressors (i.e., *Tsix* or positive regulators of this gene) instead of *Xist*. Probably, xiRNAs are involved in this process. They can play the same role that miRNAs play in the allelic exclusion mechanism described above.

Frequency of CG and CNG sites in *Tsix* is even less than in *Xist* and amounts to 0.6%. The greatest peak of the concentration of these sites (2.4% and 8.2%, respectively) is localized near the region, overlapping *Xist* sequence, although this region contains other peaks. Perhaps because of this feature, the repression wave, triggered as a result of xiRNA binding in the bidirectionally transcribed region, should be directed toward the *Tsix* promoter. As a result, *Xist* remains active, whereas *Tsix* undergoes the allelic exclusion.

Interfering RNA can cause gene silencing due to direct hybridization with the target DNA sequences. This involves DNA methyltransferases in methylation *de novo* of cytosine within DNA targets. DNA methylation recruits histone deacetylases as well as histone methyltransferases, which cause chromatin remodeling and gene repression. Such events constitute molecular mechanism of the RNA-dependent DNA methylation. It is possible, that not only miRNAs and siRNAs, but also endo-siRNAs and piRNAs can cause gene silencing in that way.

Allelic exclusion is the ancient mechanism counteracting the activity of mobile genetic elements. The molecular basis of the allelic exclusion is that the miRNA (or another non-coding RNA), which precursor is transcribed from one allele, triggers DNA methylation *de novo* in all other alleles present in the cell. Immunoglobulin gene loci, which, as is known, undergo the allelic exclusion, contain genes of non-coding RNAs that are miRNAs or miRNA candidate.

The lack of interfering RNAs possibly predetermine the progressive DNA demethylation that allows reactivation of silent transposons and subsequent genome instability. Activated in response, the DNA repair systems should cause also illegitimate recombination in telomere caps, resulting in quick exhaustion of telomeres due to conversion of T-loops into T-circles. Therefore, the telomere length is integral indicator of genomic stability in

normal cells. Consequently, ageing is a result of activity of mechanisms that causes apoptosis of cells that have a higher risk of transformation.

X-inactivation can be also mediated through the RNA-dependent DNA methylation. In this case, large non-coding RNA *Xist* should hybridize during own synthesis with DNA targets in remote regions of X chromosome. Obviously, the RNA-DNA interaction is universal mechanism triggering the DNA methylation *de novo* and the chromatin repression.

References

1. Sana J., Faltejskova P., Svoboda M. et al. // J. Transl. Med. – 2012. – **10**. – P. 103.
2. Ogawa Y., Sun B. K., Lee J. T. // Science. – 2008 – **320**, N 5881. – P. 1336–1341.
3. Kaikkonen M. U., Lam M. T., Glass C. K. // Cardiovasc. Res. – 2011. – **90**, N 3. – P. 430–440.
4. Seila A. C., Calabrese J. M., Levine S. S. et al. // Science. – 2008. – **322**, N 5909. – P. 1849–1851.
5. Hansen T. B., Jensen T. I., Clausen B. H. et al. // Nature. – 2013. – **495**, N 7441. – P. 384–388.
6. Esteller M. // Nat. Rev. Genet. – 2011. – **12**, N 12. – P. 861–874.
7. Halytskyi V. // Eur. J. Cancer. – 2011. – **47**, Suppl., N 1. – P. 111.
8. Halytskyi V. // The Breast. – 2013. – **22**, Suppl., N 1. – P. S21.
9. Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M. et al. // Nature. – 2001. – **409**, N 6818. – P. 363–366.
10. Zamore P. D. // Science. – 2002. – **296**, N 5571. – P. 1265–1269.
11. Tijsterman M., Plasterk R. H. A. // Cell. – 2004. – **117**, N 1. – P. 1–3.
12. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J. L. et al. // Genome Res. – 2004. – **14**, N 10A. – P. 1902–1910.
13. Lee Y., Ahn C., Han J. et al. // Nature. – 2003. – **425**, N 6956. – P. 415–419.
14. Lund E., Guttinger S., Calado A. et al. // Science. – 2004. – **303**, N 5654. – P. 95–98.
15. He L., Hannon G. J. // Nat. Rev. Genet. – 2004. – **5**, N 7. – P. 522–531.
16. Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B. et al. // Genome Res. – 2009. – **19**, N 1. – P. 92–105.
17. Lewis B. P., Burge C. B., Bartel D. P. // Cell. – 2005. – **120**, N 1. – P. 15–20.
18. Kawasaki H., Taira K. // Nature. – 2004. – **431**, N 7005. – P. 211–217.
19. Jabbari K., Bernardi G. // Gene. – 2004. – **333**. – P. 143–149.
20. Scarano E., Iaccarino M., Grippo P. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1967. – **57**, N 5. – P. 1394–1400.
21. Halytskyi V. A. // Acta Biochim. Pol. – 2007. – **54**, Suppl., N 2. – P. 5.3.
22. Halytskyi V. A. // Eur. J. Cancer Suppl. – 2007. – **5**, N 4. – P. 75.
23. Halytskyi V. A., Komisarenko S. V. // Biopolym. Cell. – 2011. – **27**, N 6. – P. 466–472.
24. Галицкий В. А. // Цитология. – 2008. – **50**, № 4. – С. 277–286.
25. Halytskyi V. A. // Ukr. Biochem. J. – 2009. – **81**, № 4 (special issue). – P. 162.

26. Schmitz K. M., Mayer C., Postepska A. et al. // *Genes Dev.* – 2010. – **24**, N 20. – P. 2264–2269.
27. Bonasio R., Tu S., Reinberg D. // *Science.* – 2010. – **330**, N 6004. – P. 612–616.
28. Verdel A., Jia S., Gerber S. et al. // *Science.* – 2004. – **303**, N 5658. – P. 672–676.
29. Verdel A., Moazed D. // *FEBS Lett.* – 2005. – **579**, N 26. – P. 5872–5878.
30. Bühler M., Verdel A., Moazed D. // *Cell.* – 2006. – **125**, N 5. – P. 873–886.
31. Halytskiy V. A. / XX International Congress of Genetics. Abstract book. – Berlin, Germany, 2008. – P. 119–120.
32. Piriyaopongsa J., Mariño-Ramírez L., Jordan I. K. // *Genetics.* – 2007. – **176**, N 2. – P. 1323–1337.
33. Soifer H. S., Zaragoza A., Peyvan M. et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – **33**, N 3. – P. 846–856.
34. Bourc'his D., Bestor T. H. // *Nature.* – 2004. – **431**, N 7004. – P. 96–99.
35. Jackson-Grusby L., Beard C., Possemato R. et al. // *Nat. Genet.* – 2001. – **27**, N 1. – P. 31–39.
36. Halytskiy V. A., Komisarenko S. V. // *Biopolym. Cell.* – 2009. – **25**, N 1. – P. 12–26.
37. Halytskiy V. A. // *Acta Biochim. Pol.* – 2011. – **58**, Suppl., N 1. – P. 8.
38. Lander E. S., Linton L. M., Birren B. et al. // *Nature.* – 2001. – **409**, N 6822. – P. 860–921.
39. Prak E. T., Kazazian H. H., Jr. // *Nat. Rev. Genet.* – 2000. – **1**, N 2. – P. 134–144.
40. Brouha B., Shustak J., Badge R. M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – **100**, N 9. – P. 5280–5285.
41. Pardue M. L., Rashkova S., Casacuberta E. et al. // *Chromosome Res.* – 2005. – **13**, N 5. – P. 443–453.
42. Curcio M. J., Belfort M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – **104**, N 22. – P. 9107–9108.
43. Kazazian H. H., Jr. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 1998. – **8**, N 3. – P. 343–350.
44. Collier L. S., Largaespada D. A. // *Genome Biol.* – 2007. – **8**, Suppl., N 1. – P. S5.
45. Ostertag E. M., Goodier J. L., Zhang Y. et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2003. – **73**, N 6. – P. 1444–1451.
46. Iskow R. C., McCabe M. T., Mills R. E. et al. // *Cell.* – 2010. – **141**, N 7. – P. 1253–1261.
47. Jeffs A. R., Benjes S. M., Smith T. L. et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 1998. – **7**, N 5. – P. 767–776.
48. Stoye J. P. // *Curr. Biol.* – 2001. – **11**, N 22. – P. R914–916.
49. Rowe H. M., Jakobsson J., Mesnard D. et al. // *Nature.* – 2010. – **463**, N 7278. – P. 237–240.
50. Murray V. // *Mutat. Res.* – 1990. – **237**, N 2. – P. 59–63.
51. Yoder J. A., Walsh C. P., Bestor T. H. // *Trends Genet.* – 1997. – **13**, N 8. – P. 335–340.

52. *Tabara H., Sarkissian M., Kelly W. G. et al. // Cell. – 1999. – 99, N 2. – P. 123–132.*
53. *Aravin A. A., Sachidanandam R., Bourc’his D. et al. // Mol. Cell. – 2008. – 31, N 6. – P. 785–799.*
54. *Girard A., Hannon G. J. // Trends Cell Biol. – 2008. – 18, N 3. – P. 136–148.*
55. *Malone C. D., Hannon G. J. // Cell. – 2009. – 136, N 4. – P. 656–668.*
56. *Vanyushin B. F., Nemirovsky L. E., Klimenko V. V. et al. // Gerontologia. – 1973. – 19, N 3. – P. 138–152.*
57. *Riggs A. D., Xiong Z. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – 101, N 1. – P. 4–5.*
58. *Галицкий В. А. // Цитология. – 2009. – 51, № 5. – С. 388–397.*
59. *Georgantas R. W., Hildreth R., Morisot S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – 104, N 8. – P. 2750–2755.*
60. *Halytskiy V. A. // Eur. J. Cancer Suppl. – 2010. – 8, N 5. – P. 127.*
61. *Kazazian H. H., Jr., Moran J. V. // Nat. Genet. – 1998. – 19, N 1. – P. 19–24.*
62. *Wang K. C., Chang H. Y. // Mol. Cell. – 2011. – 43, N 6. – P. 904–914.*
63. *Guil S., Esteller M. // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2012. – 19, N 11. – P. 1068–1075.*
64. *Navarro P., Oldfield A., Legoupi J. et al. // Nature. – 2010. – 468, N 7322. – P. 457–460.*
65. *Halytskiy V. / Joint Conference of HGM 2013 and 21st International Congress of Genetics “Genetics & Genomics of Global Health and Sustainability”. Abstract Book. – Singapore, 2013. – P. 282–283.*
66. *Nesterova T. B., Popova B. C., Cobb B. S. et al. // Epigenetics Chromatin. – 2008. – 1, N 1. – P. 2.*

POLYADHESINS: AN ARMORY OF GRAM-NEGATIVE PATHOGENS FOR PENETRATION THROUGH THE IMMUNE SHIELD

Vladimir P. ZAV'YALOV

Joint Biotechnology Laboratory, Department of Chemistry,
University of Turku, Finland;
e-mail: vlazav@utu.fi

The rapid emergence of treatment-resistant bacterial pathogens has become a major threat to public health. The recent outbreak of new Shiga-toxin-producing Escherichia coli O104H4 infection in Germany illustrates this problem. To colonize host tissues, pathogenic bacteria express surface adhesive organelles. The German strain uses aggregative adherence fimbriae I (AAF/I) to anchor to the intestinal mucosa and induce inflammation. AAF/I belong to the family of chaperone/usher assembled fimbrial polyadhesins. Polyadhesins are functioning as an armory for penetration through the host immune shield. The polyadhesin-binding to the target cells is orchestrated with injectisome (third secretion system), which is extremely important for bacterial virulence, and triggers subversive signals by aggregation of host cell receptors that allow pathogens to mislead and evade immune defense. Polyadhesins also are involved in biofilm formation making bacteria more resistant to immune response. Because of this, the polyadhesins are potential targets for immune countermeasures against bacterial infections, in particular for anti-adhesion therapy with antibodies to polyadhesins as one of alternatives to antibiotic therapy.

Adhesive organelles of bacterial pathogens are crucial virulence factors, mediating attachment to the target cells of their hosts and initiating infectious process. They also are involved in biofilm formation making bacteria more resistant to immune response.

Gram-negative pathogens possess two major classes of proteinaceous adhesins (Zav'yalov et al., 2010):

- The fimbrial adhesive organelles, represented by the linear homopolymers or heteropolymers (up to 7 distinct subunits) of hundreds to thousands of protein subunits;
- The non-fimbrial adhesins consisted of a single protein or homo-trimers.

Most of fibrillar adhesive organelles are assembled by the chaperone/usher (CU) machinery. These organelles possess diverse subunit composition, architecture and function. The superfamily of fimbrial orga-

nelles is divided in two functionally distinct families: monoadhesins and polyadhesins (Zavialov et al., 2007; Zav'yalov et al., 2010).

Monoadhesins comprises in main the thick rigid and thin flexible adhesive pili (also known as adhesive fimbriae) of a complex subunit composition (up to 7 distinct subunits), which typically display only one adhesive domain on the tip of the pilus. The assembly of monoadhesins is assisted with the FGS (having a short F1-G1 loop) class of periplasmic chaperones (Hung et al., 1996; Zav'yalov et al., 1995b). The monoadhesins are encoded in main by the gene clusters of the γ 1-, γ 2-, γ 4-, and π -monophyletic groups (Nuccio & Bäumlner, 2007).

Polyadhesins, typically, have non-pilus, amorphous or capsule-like morphology. They either comprise homopolymers, which consist of only one type of subunit, or heteropolymers, which consist up to 6 distinct subunits. The notable property of polyadhesins is that all subunits of homopolymers or one of the main structural subunits of heteropolymers possesses one or two independent binding sites specific to different host cell receptors (Zavialov et al., 2007; Zav'yalov et al., 2010). Assembly of one subfamily of polyadhesins is assisted with the FGL (having a long F1-G1 loop) class of periplasmic chaperones (Hung et al., 1996; Zav'yalov et al., 1995b). FGL chaperone-assembled polyadhesins are encoded exclusively by the gene cluster of the γ 3-monophyletic group (Nuccio & Bäumlner, 2007). The assembly of another subfamily of polyadhesins is assisted with the FGS class of chaperones. FGS chaperone-assembled polyadhesins are encoded in main by the gene cluster of the κ -monophyletic group (Nuccio & Bäumlner, 2007). Recently a novel member of polyadhesin family, the *Escherichia coli* common pilus (ECP), has been revealed (Garnett et al., 2012; Garnett & Matthews, 2012). The ECP has the unique architecture. It is composed of two sequentially combined polyadhesive homopolymers of EcpA and EcpD subunits, respectively, with a dual role in biofilm formation and host cell recognition. The ECP is assembled via alternative CU pathway (Korea et al., 2011) and encoded by the gene cluster related to the α -monophyletic group (Nuccio & Bäumlner, 2007).

Polyadhesins are functioning as an armory for penetration through the host immune shield. The polyadhesin-binding to the target cells is orchestrated with injectisome (third secretion system), which is extremally important for bacterial virulency, and triggers subversive signals by aggregation of host cell receptors that allow pathogens to mislead and evade immune defense (Zavialov et al., 2007; Zav'yalov et al., 2010; Zav'yalov, 2012). Polyadhesins also are involved in biofilm formation making bacteria more resistant to immune response (Garnett et al., 2012; Garnett & Matthews, 2012). Because of this, the polyadhesive organelles are potential targets for immune countermeasures against bacterial infections, in particular for

anti-adhesion therapy with antibodies as one of alternatives to antibiotic therapy (Kovacs-Nolan & Mine, 2012; Oleksiewicz et al., 2012).

Several excellent reviews focused on the results of the structure/functional studies of FGS-chaperone assembled fimbrial monoadhesins have been published recently. Among the later were the reviews by Allen, Phan & Waksman, 2012; Busch & Waksman, 2012; Geibel & Waksman, 2011; Kline et al., 2010; Lo et al., 2013. However, the last comprehensive review on the structure, function, phylogenesis and clinical applications of polyadhesins was published by us more than three years ago (Zav'yalov et al., 2010). The recently accumulated significant knowledge on different aspects of biogenesis of the growing family of Gram-negative polyadhesins and their clinical applications requires a new analysis and generalization.

1. ORGANIZATION OF GENE CLUSTERS ENCODING POLYADHESINS

Genes of proteins involved in the expression and assembly of polyadhesive fibers via the CU pathway are arranged into compact gene clusters, which are located either on the chromosome or on the plasmids of Gram-negative bacteria. Depending on the structural properties of periplasmic chaperones and phylogenetic classification, suggested by Nuccio & Bäumlér (2007), they can be divided into three families:

- (1) FGL chaperone-comprising gene clusters related to the γ 3-monophyletic group;
- (2) FGS chaperone-comprising gene clusters related to the κ -monophyletic group;
- (3) Alternative chaperone-comprising gene cluster(s) related to the α -monophyletic group.

1.1. FGL Chaperone-Comprising Gene Clusters Related to the γ 3-Monophyletic Group

Our studies, which opened the way to finding a family of polyadhesins, began with the cloning and sequencing of the genes responsible for the formation of the capsule of *Yersinia pestis*, the causative agent of pneumonic plague.

Encoded by the *caf* gene cluster fraction 1 (F1), capsular antigen from *Y. pestis* comprises aggregated high-molecular-weight linear polymers of a single subunit Caf1 (Zavialov et al., 2002, 2003, 2005, 2007; Zav'yalov et al., 2010; Zav'yalov, 2012). The genes of the *caf* gene cluster, *caf1*, *caf1M*, *caf1A* and *caf1R*, encode, respectively, for Caf1 subunit, periplasmic chaperone Caf1M, an outer membrane assembler, the molecular usher Caf1A and the protein Caf1R regulating gene cluster transcription (Chapman et al., 1999; Dubnovitsky et al., 2010; Galyov et al., 1990, 1991; Karlyshev

et al., 1992a, b, 1994; MacIntyre et al., 2001; Yu et al., 2009, 2012a, b; Zavialov et al., 2001; Zavialov & Knight, 2007).

The *psa* gene cluster from *Y. pestis* encodes proteins for expression and assembly of the fimbrial pH6 (Psa) antigen comprising the high-molecular-weight polymer of the PsaA subunit (Lindler & Tall, 1993). PsaB functions as the periplasmic chaperone and PsaC as the molecular usher. Two additional proteins, PsaE and PsaF, have been shown to regulate the transcription of the *psaA* gene (Yang & Isberg, 1997). Another transcriptional regulator, RovA, interacts with the *psaE* and *psaA* promoter regions, suggesting that RovA is an upstream regulator of the *psa* gene cluster (Cathelyn et al., 2006). Identical *psa* gene clusters are present in *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* (Lindler & Tall, 1993).

Closely related to the *psa* gene cluster of *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* contains *myf* encoding the Myf fimbriae, which are built up of MyfA subunits (Iriarte et al., 1993). The *psa* and *myf* clusters have a similar general organization. Moreover, proteins encoded by these gene clusters display a significant sequence similarity, suggesting that the pH6 (Psa) antigen and Myf fimbriae have a common function in the different species of *Yersinia*. Like PsaE and PsaF encoded by *psa*, the MyfE and MyfF proteins encoded by *myf* play a role in the regulation of cluster transcription (Iriarte & Cornelis, 1995).

The *cs-3* gene cluster from *E. coli* encodes for proteins for expression and assembly of the colonization factor-3 that forms CS-3 fimbriae comprising the high-molecular-weight polymer of the CS-3 subunit (Jalajakumar et al., 1989). CS3-E functions as the periplasmic chaperone and CS3-D as the molecular usher.

The *nfa* gene cluster from *E. coli* encodes proteins for the expression and assembly of the nonfimbrial adhesin, NFA-I, comprising the high-molecular-weight polymer of the NfaA subunit (Ahrens et al., 1993). NfaE functions as the periplasmic chaperone and NfaE as the molecular usher.

A group of *E. coli* gene clusters, *afa-3*, *afa-8*, *agg*, *aaf*, *agg-3*, *dafa*, *dra* and *daa*, which encode proteins for the expression and assembly of the afimbrial adhesins Afa-III and AfaE-VIII, the aggregative adherence fimbria type I, II and III (AAF/I, AAF/II and AAF-III), the diffuse adherence fibrillar adhesin (Dafa), the Dr hemagglutinin flexible fimbriae and the F1845 (DaaE) fimbrial adhesin, respectively, have a peculiar feature: each gene cluster encodes additional subunit D, for which an invasive function was suggested (putative invasin subunit; Jouve et al., 1997; Servin, 2005). DraE and AfaE-III adhesins may assemble into a flexible fiber, which provides the link between the usher at the outer membrane and the putative invasion subunit located at the tip of the fiber (Anderson et al., 2004a, b; Pettigrew et al., 2004). However, expression of DraD in-

vasin subunit is independent of the DraC usher and DraE fimbrial subunit (Zalewska et al., 2005). In addition, polymerization of DraE fimbrial subunits into fimbrial structures does not require the expression of DraD. Recently, Zalewska-Piątek et al. (2008) showed that type II secretion in *E. coli* strain Dr1 leads to DraD translocation to the bacterial cell surfaces. Korotkova et al. (2008b) and Guignot et al. (2009) demonstrated that the DraD subunit is not required for $\beta 1$ integrin recruitment or bacterial internalization. Therefore, the function of D subunits is still in question.

The *Salmonella* spp. gene clusters *saf*, *sef*, *cs6-1* and *cs6-2*, which encode proteins for the expression and assembly of the atypical fimbriae Saf, the filamentous fimbriae-like structures SEF14/18 and the colonization factors CS6-1 and -2, respectively, have another common peculiar feature: all of these gene clusters encode two adhesin subunits. The SefB chaperone of *S. enteritidis* assists in the assembly of two distinct cell-surface structures, SEF14 and SEF18, which are homopolymers of SefA and SefD subunits, respectively (Clouthier et al., 1994). The CssC chaperone assists in assembling thin CS6 fibrillae, which are composed of two heterologous CssA and CssB subunits (Wolf et al., 1997).

1.2. FGS Chaperone-Comprising Gene Clusters Related to the κ -Monophyletic Group

The gene cluster *pef* is responsible for expression of plasmid encoded (PE) fimbriae of *S. typhimurium* composed of only one structural subunit, which probably functions as an adhesin subunit. A cosmid carrying the *pef* operon was introduced into *E. coli* and expression of fimbrial filaments composed of PefA was confirmed by flow cytometry and immune electron microscopy (Chessa et al., 2008). PE fimbriae were purified from the surface of *E. coli* and the resulting preparation was shown to contain PefA as the sole major protein component. Binding of purified PE fimbriae to a glycan array suggested that this adhesin specifically binds the trisaccharide Galss1-4 (Fucal-3) GlcNAc, also known as the Lewis X (Lex) blood group antigen.

The gene clusters *fan*, *lda*, *fae* and *ral* encode proteins for the expression and assembly of the F4 (K88), Lda and F5 (K99) thin flexible pili and rabbit-specific enteropathogenic *E. coli* (REPEC) fimbriae of *E. coli*, respectively (Bakker et al., 1991; Adams et al., 1997; Scaletsky et al., 2005). These pili/fimbriae consist of four or five subunits. However, F4 (K88), F5 (K99) and Lda pili do not display specialized adhesive domains on the tip of the pilus, but carry binding sites on their main structural subunit (FanG, FaeG and LdaG) (Bakker et al., 1991; Scaletsky et al., 2005; Van Molle et al., 2009). The overall arrangement of the *ral* gene cluster closely resembles that of the *fae* cluster, with homologous genes occupying the

same relative position in each cluster. The *ral* cluster also has some of the more specific features of the *fae* cluster, such as the overlapping reading frames of the genes encoded chaperone and usher and the apparent absence of promoters within the region carrying the structural genes (Adams et al., 1997). This general similarity, together with the significant levels of homology exhibited by individual genes, makes it reasonable to propose functions for the *ral* gene products based on the known roles of their Fae counterparts. Thus, Adams et al. (1997) proposed that RalC, RalF and RalH are minor fimbrial subunits of the fimbrial structure, which is primarily composed of RalG, the major fimbrial subunit. The gene cluster *afr* encodes proteins for the expression and assembly of the *E. coli* AF/R1 pili (Cantey et al., 1999). The subunits encoded by the *afr* gene cluster have the highest percentage amino acid identity with the subunits encoded by the *ral* cluster (Adams et al., 1997).

The *fed* gene cluster, encoding the F18 fimbriae, is composed of five genes, encoding the major subunit FedA, the usher protein FedB, the periplasmic chaperone FedC, the minor pilin FedE and the adhesin FedF (Imberechts et al., 1996; Smeds et al., 2001). Based on usher phylogeny, the *fed* cluster falls into the κ -fimbrial clade of CU systems (Nuccio & Baumber, 2007). However, Moonens et al. (2012) demonstrated that FedF, the F18 adhesin responsible for ABH glycosphingolipid binding, is a two domain adhesin typical for monoadhesive fimbrial organelles.

1.3. Alternative Chaperone-Comprising Gene Cluster(s) Related to the α -Monophyletic Group

The most characterized member of this new family, *ecp* (or *mat*) gene cluster, encodes the *E. coli* common pilus (ECP), composed of two sequentially combined polyadhesive homopolymers of EcpA and EcpD subunits, respectively, with a dual role in biofilm formation and host cell recognition (Garnett et al., 2012; Garnett & Matthews, 2012). The *ecp* operon is composed of six genes: *ecpR*, *ecpA*, *ecpB*, *ecpC*, *ecpD*, and *ecpE*. Examination of EcpR revealed its function as transcriptional regulator (Martinez-Santos et al., 2012), whereas primary sequence analysis of EcpB, EcpC, and EcpE (Garnett et al., 2012) detected low but significant similarity with a variety of chaperone and usher proteins from the CU family (Nuccio & Baumber, 2007). The typical sequence identity is <17% with all known usher (EcpC) and chaperone (EcpB and EcpE) structures. Although sequence analysis of EcpD (~60 kDa) revealed no matches with other proteins, inspection of the N termini in EcpA and EcpD showed a significant level of similarity (Garnett et al., 2012). Korea et al. (2011) related the *mat* (or *ecp*) gene cluster to the α -monophyletic group of alternative CU pathway (Nuccio & Bäumer, 2007).

The ECP is highly conserved between enteric bacterial species (Garnett et al., 2012). *Serratia proteamaculans*, *S. odorifera*, *Klebsiella sp.*, *K. pneumoniae* and *Enterobacter cancerogenus* possess fimbrial subunits with high homology to EcpA (80, 82, 98, 97 and 96% sequence identity, respectively), which may suggest a role for ECP in stabilizing multispecies biofilms by interactions through EcpA orthologs.

2. STRUCTURE OF POLYADHESIN SUBUNITS

2.1. 3D Structure of Chaperone-Complemented Subunits

Chaperone-free subunits of fimbrial polyadhesins (Zav'yalov et al., 1997; Zavialov et al., 2005) and monoadhesive fimbriae/pili (Bann et al., 2004; Nishiyama et al., 2003) are highly unstable and prone to form aggregates. Hence, structural information on many subunits of these organelles was obtained by studying chaperone-subunit complexes (Choudhury et al., 1999; Remaut et al., 2006; Sauer et al., 1999, 2002; Verger et al., 2007; Zavialov et al., 2003, 2005).

Fig. 1 shows ribbon diagrams of the Caf1M-Caf1 (Zavialov et al., 2003, 2005) and SafB-SafA (Remaut et al., 2006) complexes. These complexes reveal the chaperone-bound conformation of FGL chaperone-assembled polyadhesin subunits. The polyadhesin subunits Caf1 and SafA have an incomplete immunoglobulin-like fold. Despite the lack of significant sequence similarity, polyadhesin subunits display similar organization of the B, C, E and F β -strands, which are known to form a common structural core of the immunoglobulin-like fold (Bork et al., 1994).

End of the F1-G1 loop and the beginning of the G1 β -strand in Caf1M harbor a subunit-binding motif of five alternating bulky hydrophobic residues (V126, V128, V130, F132 and I134) (Zavialov et al., 2003, 2005). The same region in the SafB molecule harbors a similar five-residue motif of one small hydrophobic (A114) and four bulky hydrophobic residues (L116, L118, L120 and I122) (Remaut et al., 2006). The rest of the F1-G1 loop (residues 104-123 in Caf1M and 104-113 in SafB) is disordered in the crystal structures. Another subunit-binding motif in FGL chaperones of three alternating hydrophobic residues (Y12 in Caf1M/F12 in SafB, V14 and I16) is localized in a long N-terminal sequence, which forms the A1 strand. A1 and G1 β -strands are the edge strands of the β -sandwich fold of the N-terminal domain. In the complex A1 and G1, β -strands are extended due to the partial ordering of the N-terminal sequence and the F1-G1 loop, respectively, to form a binding platform, exposing the hydrophobic residues of the binding motifs. In addition to this binding structure, Caf1M and SafB chaperones apply a pair of conserved positively charged residues

(R20 and K139 in Caf1M and R20 and K127 in SafB) to bind subunits by anchoring their C-terminal carboxyl groups.

Fig. 2A and C illustrate how the Caf1 subunit is complemented by the Caf1M chaperone (Zavialov et al., 2003, 2005). The absence of the seventh (G) strand results in a six-stranded β -sandwich where the hydrophobic core of Caf1 is partially exposed in a long and deep hydrophobic groove. Caf1 interacts mainly with the N-terminal domain in Caf1M (Fig. 1). These two proteins bind via edge strands in Caf1 and in the N-terminal domain of Caf1M to form a closed barrel with a common core (Zavialov et al., 2003). Strand G1 in Caf1M is hydrogen-bonded to strand F in Caf1. Chaperone A1 strand is hydrogen-bonded to subunit strand A. Hydrophobic residues from the Caf1M chaperone G1 strand are donated to the Caf1 subunit to compensate for the missing G strand (Fig. 1 and 2). The longer G1 donor strand of the Caf1M chaperone inserts a motif of five bulky hydrophobic

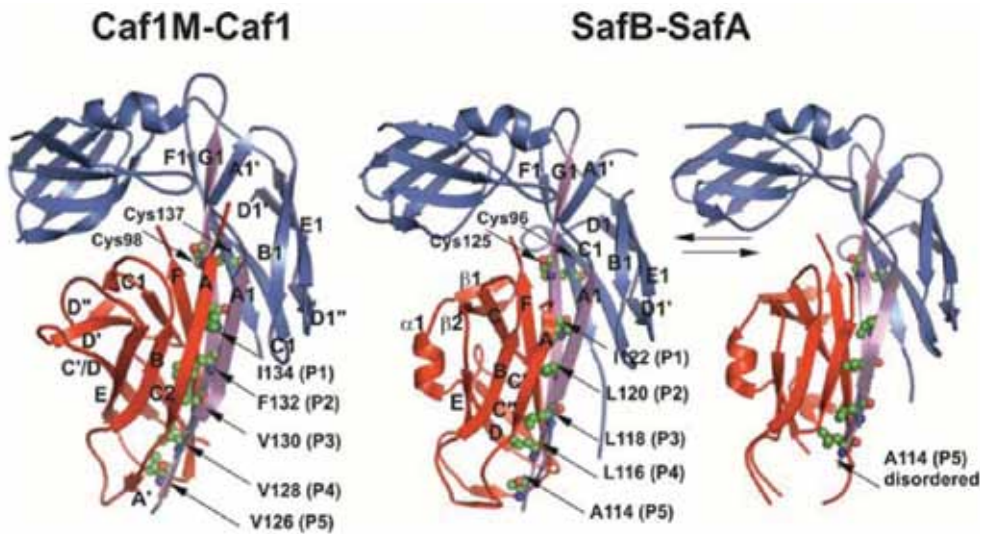


Fig. 1. Ribbon presentation of the crystal structures of Caf1M–Caf1 and SafB–SafA complexes. The chaperones are blue with G1 and A1 edge strands in violet; the subunits are red. The two conserved Cys residues in the whole FGL family that form disulfide bond are shown as ball-and-stick. The hydrophobic residues in the G1 strand of the chaperones that interact with the P5–P1 pockets of the subunits are also shown as ball-and-stick. The SafB residue A114, which interacts with the P5 pocket, is in equilibrium between a bound (left, type I structure) and an unbound (right, type II structure) state in the P5 pocket. The structures were redrawn based on the coordinates of atoms published by Zavialov et al. (2003, 2005) (PDB accession number 1P5V) and Remaut et al. (2006) (PDB accession numbers 2CO6 and 2CO7). All figures were prepared with PYMOL (DeLano, 2002)

residues (P1–P5 residues; see Fig. 1 and 2) into five binding pockets in the hydrophobic groove of the Caf1 subunit (P1–P5 binding pockets).

The crystal structures of the Caf1M–Caf1 and SafB–SafA complexes show a considerably larger interactive area between the chaperone and the subunit than that found in the FGS chaperone–pilin complexes (Choud-

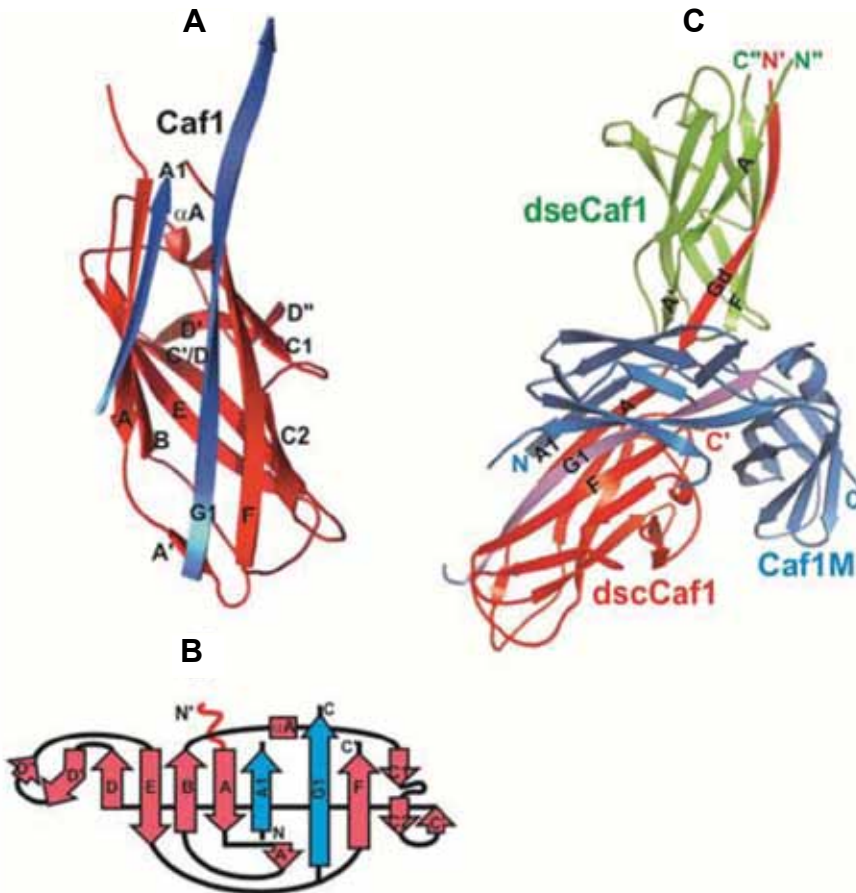


Fig. 2. (A, C) Structure of the Caf1 polyadhesin subunit complemented with Caf1M chaperone. The Caf1 polyadhesin subunit is shown in red with donor strands from Caf1M chaperone (blue). Only interacting chaperone–subunit strands are shown. (B) Ribbon diagram of the native Caf1M–Caf1'–Caf1'' complex. Caf1M is blue, except for G1 and A1 β -strands (violet). The chaperone-bound Caf1' subunit and N-terminal donor strand (Gd) are red; the Caf1'' subunit corresponding to the tip of growing fiber is green. The N- and C-termini are labeled in the same colours as the ribbons. The redrawing is based on the coordinates of atoms of structures published by Zavialov et al. (2003, 2005) (PDB accession numbers 1P5V and 1Z9S). The figures A and C were prepared with PYMOL (DeLano, 2002)

hury et al., 1999; Sauer et al., 1999, 2002; Verger et al., 2007). This is a result of the presence of a more extended hydrophobic groove in the CafI and SafA subunits than in pilus subunits, which is complemented by subunit-binding motifs of CafIM and SafB containing the additional FGL-specific sequences. However, the major F1–G1–loop–G1 β -strand-binding motif of SafB contains four rather than five bulky hydrophobic residues (L116, L118, L120 and I122), which interact with the hydrophobic P4–P1 pockets of the subunit's groove. The fifth donor residue inserting into pocket P5 is a small A114. Two crystal forms of the SafB–SafA complex were observed that differ in the extent of ordering around A114 (Fig. 1) (Remaut et al., 2006). In type I crystals, A114 is ordered and is inserted into the P5 pocket of the SafA subunit (Fig. 1). In type II crystals, this residue is disordered and does not insert into the P5 pocket (Fig. 1). As a result, the loops and secondary structure elements in the SafA subunit that form this P5 pocket are also disordered and are not observed in the electron density map. These two structures suggest equilibrium between the two states of the SafB–SafA complex as a result of a weak binding of the chaperone G1 donor strand at the P5 site of the SafA-binding groove (Remaut et al., 2006).

2.2. 3D Structure of Subunit in the Fiber

The elucidation of crystal structure of *Y. pestis* F1 minimal fiber CafIM–CafI'–CafI'' (ternary complex) was an important step in understanding the general principles of subunit assembly via the CU pathway. This structure revealed the fiber conformation of the organelle subunit (CafI'') and subunit–subunit interactions in fibers (Zavialov et al., 2003, 2005). The structure of CafIM and the chaperone-bound CafI' subunit is virtually the same as in the CafIM–CafI binary preassembling complex. However, in contrast to the disordered N-terminal region of CafI in binary complex, the N-terminal region of CafI' is ordered and forms an antiparallel donor β -strand interaction with the last (F) β -strand of the chaperone-free CafI'' subunit (Fig. 2B). The donated strand produces a bona fide immunoglobulin-like topology in the fiber subunit. The N-terminal donor strand was denoted as 'Gd' (d for donor) because it plays the same structural role in the fiber as it does in the (C-terminal) G strand of the canonical immunoglobulin fold (Zavialov et al., 2003). Thus, the release of the subunit from the chaperone–subunit complex and its incorporation into a growing fiber involves an exchange of G1 and A1 donor strands of the chaperone to the Gd strand of the neighboring subunit in the fiber. The replacement of the G1 strand by the Gd strand also involves a change of direction of the donor strand from parallel to antiparallel to the F β -strand of the subunit. This process was predicted earlier for FGS chaperone-

assembled adhesive pili (Choudhury et al., 1999; Sauer et al., 1999) and for FGL chaperone-assembled polyadhesins (Zavialov et al., 2002) and was termed 'donor-strand exchange'. A similar 'topological transition' (Sauer et al., 2002) was also observed for the P pilus subunit PapE bound to a peptide designed to have the sequence of the proposed donor strand of the PapK subunit, suggesting that the donor-strand exchange takes place during assembly of both types of organelles.

2.3. Chaperones Preserve Folding Energy of Subunits for Driving of the Fiber Assembly

No energy input from external sources is required to convert periplasmic chaperone-subunit preassembly complexes to free chaperone and secreted fibers (Jacob-Dubuisson et al., 1994), in spite of a much more extensive interface between a chaperone and a subunit than that between fiber subunits (Zavialov et al., 2003). Some clues as to how the process can be energetically driven have been provided by structural studies (Sauer et al., 2002; Verger et al., 2007; Zavialov et al., 2003, 2005). Comparison of a chaperone complemented (Caf1') with a fiber subunit (Caf1'') revealed a large conformational difference (Zavialov et al., 2003, 2005). The fiber conformation was referred to as the 'closed' or the 'condensed' conformation (Zavialov et al., 2005). The observed difference between open and closed conformations, involving a rearrangement and condensation of the subunit hydrophobic core, suggested that periplasmic chaperones might trap subunits in a high-energy molten globule-like folding intermediate state (Zavialov et al., 2003). A model was proposed in which release of the subunit, followed by Gd donor-strand complementation, allows folding to be completed, driving fiber formation (Zavialov et al., 2003). In contrast to the bulky hydrophobic donor residues in the chaperone G1 donor strand, many smaller donor residues in the subunit N-terminal Gd donor segment do not intercalate between the two sheets of the subunit β -sandwich, allowing close contact between the two sheets (Zavialov et al., 2003, 2005).

A significant stabilizing contribution from the final fine packing of the hydrophobic core of the subunit is suggested by the melting of the native ternary complex. Structurally observed complete collapse of the Gd-complemented fiber Caf1'' subunit results in a dramatic increase in enthalpy and transition temperature for melting the fiber module. Thermodynamic studies provide strong evidence for the hypothesis that collapse of the subunit hydrophobic core shifts the equilibrium toward fiber formation (Zavialov et al., 2005).

Recently, Yu et al. (2012b) performed mutagenesis of the binding motifs of the Caf1M chaperone and Caf1 capsular subunit and analyzed the effect of the mutations on the structure, stability, and kinetics of Caf1M-

Caf1 and Caf1–Caf1 interactions. The results suggest that a large hydrophobic effect combined with extensive main-chain hydrogen bonding enables Caf1M to rapidly bind an early folding intermediate of Caf1 and direct its partial folding. The switch from the Caf1M–Caf1 contact to the less hydrophobic, but considerably tighter and less dynamic Caf1–Caf1 contact occurs via the zip-out–zip-in donor strand exchange pathway with pocket 5 acting as the initiation site.

3. MOLECULAR ARCHITECTURE OF ADHESINS

The final architecture and morphology of linear fibers depend on the subunit composition and the mode of subunit–subunit interactions. These factors determine a coiling of secreted linear fibers into different structures. Fig. 3A shows the scheme of coiling of FGS chaperone-assembled thick rigid monoadhesive pili with a diameter of 7–8 nm. The data on the architecture of monoadhesins were reviewed by Allen, Phan & Waksman, 2012; Busch & Waksman, 2012; Fronzes et al., 2008; Geibel & Waksman, 2011; Kline et al., 2010; Knight et al., 2000; Lo et al., 2013; Sauer et al., 2000, 2004; Soto & Hultgren, 1999; Thanassi et al., 1998. The scheme of FGS chaperone-assembled thin flexible hetero-polyadhesins with a diameter of 2–4 nm is shown in Fig. 3B. The data on the architecture of FGS chaperone-assembled hetero-polyadhesins were reviewed by van den Broeck et al., 2000. The scheme of FGS chaperone-assembled homo-polyadhesins with a diameter of about 2 nm is shown in Fig. 3C (Chessa et al., 2008). The structures of FGL chaperone-assembled polyadhesins with a diameter of about 2 nm are shown in the Fig. 3D and E (Anderson et al., 2004a; Roy et al., 2012). Fig. F and G show the structures of alternative chaperone-assembled polyadhesin ECP (Garnett et al., 2012; Garnett & Matthews, 2012), composed of two sequentially combined polyadhesive homopolymers of EcpA and EcpD subunits, respectively (Fig. F), with a dual role in biofilm formation and host cell recognition and polyadhesive homopolymer of EcpD subunits (Fig. 3G) with a separate role in host cell recognition. The scanning electron microscopy images show that the pili of EcpA subunits are thin flexible fibers that extend several micrometers away from the bacterial surface and have a high tendency to aggregate into well-ordered parallel and ~12-nm antiparallel superstructures, implicating an important role for EcpA in biofilm formation (Garnett et al., 2012; Garnett & Matthews, 2012). The FGL chaperone-assembled polyadhesins can aggregate to form amorphous masses or capsules, for example the F1 capsular antigen (Chen & Elberg, 1977), NFA-I (Ahrens et al., 1993), NFA-I-like Dr-II (Pham et al., 1997) or afimbrial adhesins III, VII and VIII (Jouve et al., 1997; Lalioui et al., 1999).

In the case of FGS chaperone-assembled monoadhesive fimbriae/pili, the specialized adhesive subunit always occurs at the tip of fimbriae, either as the distal end of thin (~2.5 nm) and flexible fimbriae (e.g. F17G from F17 fimbriae) or at the edge of a thin (~2.5 nm) tip fibrillum that is stuck onto a relatively rigid, 1–2-mm-long and ~7.5-nm-wide right-handed helical pilus rod (e.g. PapG of P pili and FimH of type I pili) (Fig. 3A) (de Greve et al., 2007). This specialized subunit is called an adhesin. All adhesive subunits of monoadhesive fimbriae/pili are two-domain adhesins (Bouckaert et al., 2005, 2006; Choudhury et al., 1999; de Greve et al., 2007; Li et al., 2007; Westerlund-Wikström & Korhonen, 2005). A two-domain adhesion consists of an N-terminal receptor-binding domain that can be stably expressed on its own and a rather conserved C-terminal pilin domain. Both domains have an immunoglobulin-like fold and are joined via a short interdomain linker. The few known crystal structures of tip-located receptor-binding N-terminal adhesin domains of monoadhesive fimbriae/pili, PapGII, FimH and F17G/GafD, show that, despite little or no sequence identity, common to them all is an elongated β -barrel jelly-roll fold that contains the receptor-binding groove (Bouckaert et al., 2005, 2006; Choudhury et al., 1999; de Greve et al., 2007; Li et al., 2007; Westerlund-Wikström & Korhonen, 2005).

The adhesin domains differ in disulfide patterns, the size and location of the ligand-binding groove, as well as in the mechanism of receptor binding. In particular, their glycan-binding sites have evolved in different locations onto this similar scaffold, and with distinct, highly specific binding properties.

Subunits of monoadhesive fimbriae are called pilins. In particular, P fimbriae are composed of ~1000 copies of the major subunit protein PapA, which polymerize to form a rigid stalk connected to a flexible tip consisting of limited copies of the minor subunit proteins PapE and PapF and receptor-binding adhesin PapG at the distal end (Lindberg et al., 1987; Kuehn et al., 1992). Type I pili are composed of up to 3000 copies of the subunit FimA, which form a stiff, helical pilus rod, and subunits FimF, FimG and FimH, which form the linear tip fibrillum. All subunits in the pilus interact via the donor-strand complementation, in which the incomplete immunoglobulin-like fold of each subunit is complemented by insertion of an N-terminal extension from the following subunit.

In the case of FGL chaperone-assembled polyadhesins, all subunits may possess two independent binding sites specific to different host-cell receptors (Anderson et al., 2004a, b; Korotkova et al., 2006a, b, 2008a, b; Pettigrew et al., 2004). Dimensions of the bacterial polyadhesive fibers Dr, whose assembly is assisted by the FGL chaperone, were investigated with negative-stain electron microscopy (Anderson et al., 2004a). Thin flexible

fibers (2nm diameter) were observed. The results are entirely consistent with the model with end-to-end contact between each subunit (Fig. 6) (Anderson et al., 2004a) and are reminiscent of the model of capsular F1 antigen from *Y. pestis*, Caf1 (Zavialov et al., 2003). Similar thin fibers have been observed for the pH6 antigen (Lindler & Tall, 1993). In addition to the predominance of thin fibers Dr, the electron microscopy also revealed a thicker morphology with overall dimensions larger than the linear model suggested (Anderson et al., 2004a). Thick fibers are not consistent with end-to-end contact and imply that more extensive intersubunit interactions also exist. This would rigidify the resulting rod by the tighter coiling of a single fiber or formation of a trimeric coiled-coil arrangement of fibers.

Runco et al. (2008) examined the ultrastructure of the *Y. pestis* capsule with whole bacteria and negative stain transmission electron microscopy. Bacteria were grown to the logarithmic phase at 37 °C, pH 7.4. The appearance of the capsule was more clearly visible than reported in previous studies, in which the capsule generally appeared as an amorphous haze or as a dense mass surrounding the bacteria (Chen & Elberg, 1977; Du et al., 2002; Liu et al., 2006). The *Y. pestis* KIM61 strain consistently produced an extended halo composed of thin fibrils and denser aggregates. This denser capsular material, likely composed of aggregates of the thin fibrils, sometimes extended out from the bacterial surface in long strands. The thin, fibrillar appearance of the F1 capsule resembles structures previously reported for other members of the FGL family of chaperone/usher pathways, including the pH6 antigen of *Yersinia* (Iriarte et al., 1993; Lindler & Tall, 1993) and the CS3 and CS6 pili of ETEC (Levine et al., 1984; Knutton et al., 1989). This supports a common structure and assembly mechanism for members of the FGL family. Salih et al. (2008) used negative-stain electron microscopy and single-particle image analysis to determine the 3D structure of the *S. typhimurium* Saf polyadhesin. The Saf polyadhesin comprises highly flexible linear multisubunit fibers that are formed by globular subunits connected to each other by short links, giving a 'beads on a string'-like appearance. Quantitative fitting of the atomic structure of the SafA polyadhesin subunit into the electron density maps, in combination with linker modeling and energy minimization, has enabled analysis of subunit arrangement and intersubunit interactions in the Saf polyadhesin. Short intersubunit linker regions provide the means for flexibility of the Saf polyadhesin by acting as molecular hinges that allow a large range of movement between consecutive subunits in the fiber.

4. FUNCTIONS OF POLYADHESINS

4.1. Common Features of Anti-Immune and Proinflammatory Activities of Polyadhesins

In contrast to mono-adhesive pili, which possess only one binding domain on the tip of the pilus (Fig. 4A), each poly-adhesive fiber potentially might (Fig. 4B):

- ensure a powerful polyvalent fastening of a bacterial pathogen to a host target cell;
- aggregate host-cell receptors and trigger transduction of signals, causing immunosuppressive and proinflammatory responses;
- pull a bacterium to a host cell by a zipper-like mechanism that increases tightness of the contact.

A tight contact between interacting cells hampers diffusion of Ca^{2+} in the site of contact and consequently triggers the Ca^{2+} -dependent type III secretion system (encoded by the pCD1 virulence plasmid) that destroys the defense activity of the host cell (Cornelis, 2010; Cornelis & Wolf-Watz, 1997; Diepold et al., 2010; Viboud & Bliska, 2005). This is extremely important for bacterial virulence. In particular, *Y. pestis* appears to utilize the type III secretion pathway to destroy cells with innate immune functions (macrophages, dendritic cells and neutrophils), which represent the first line of defense, thereby preventing adaptive responses and precipitating the fatal outcome of plague (Marketon et al., 2005). It was found that dendritic cells infected with *Y. pestis* failed to adhere to solid surfaces and to migrate toward the chemokine CCL19 in an *in vitro* transmembrane assay. Both effects were dependent on the presence of a pCD1 plasmid, and on bacterial growth shift to 37 °C, before infection (Velan et al., 2006). Moreover, although instillation of a pCD1-cured *Y. pestis* strain into mice airways triggered effective transport of alveolar dendritic cells to the mediastinal lymph node, instillation of *Y. pestis* harboring the plasmid failed to do so. Taken together, these results suggest that pCD1 virulence-plasmid-dependent impairment of dendritic cell migration is the major mechanism utilized by *Y. pestis* to subvert dendritic cell function.

Felek et al. (2010) found that *Y. pestis* adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence. The Ail, plasminogen activator (Pla) and pH6 antigen (Psa) could mediate Yop translocation to host cells. The contribution of each adhesin to binding and Yop delivery was dependent upon the growth conditions. When pre-grown at 28 °C, pH 7, the order of importance for adhesins in cell binding and cytotoxicity was Ail>Pla>Psa. *Y. pestis* grown at 37 °C, pH 7 had equal contributions from Ail and Pla, but an undetectable role for Psa. At 37 °C, pH 6, both Ail and Psa contributed to binding and Yop delivery, while Pla contributed

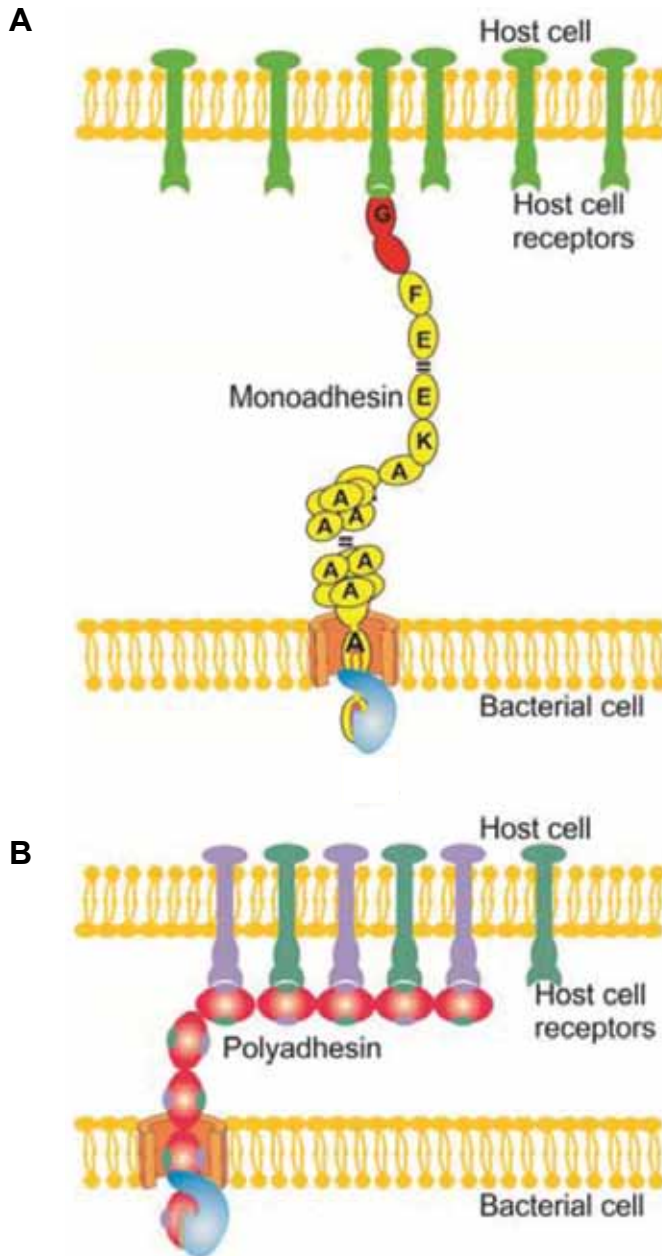


Fig. 4. Schematic illustration (elaborated by the author) of a binding of monoadhesins (A) and polyadhesins (B) to host-cell receptors. Periplasmic chaperones and outer membrane ushers are in blue and orange, respectively. Adhesin and pilin subunits are in red and yellow, respectively. Host receptors for monoadhesins are shown in green. Two different types of host receptors for polyadhesins are shown by violet and greencyan

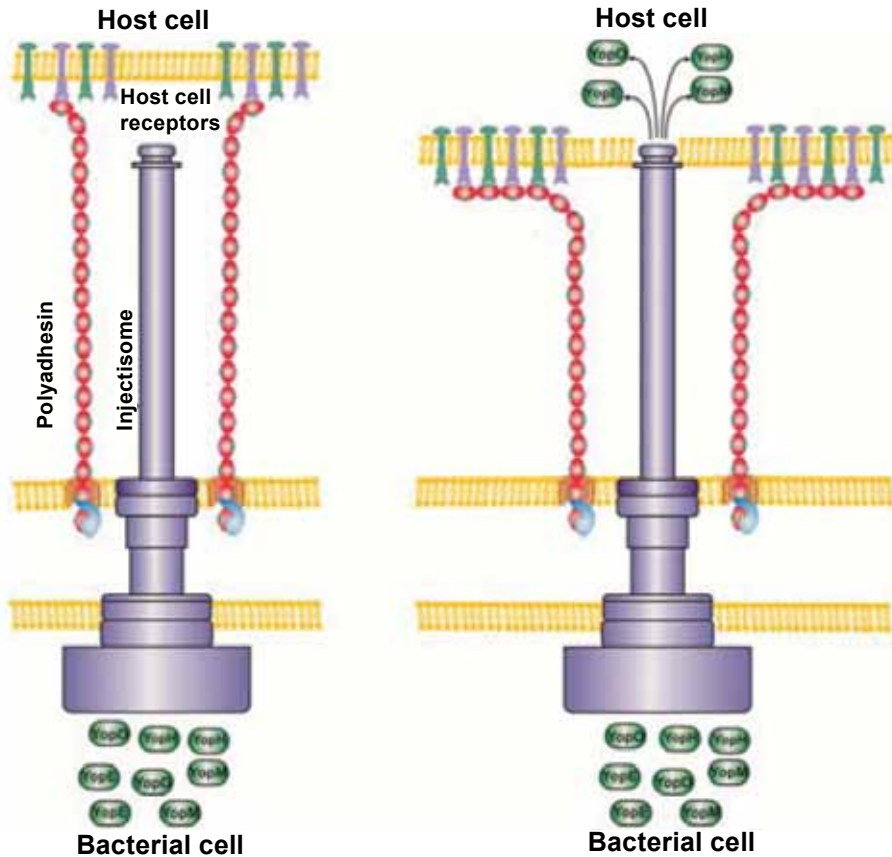


Fig. 5. The drawing elaborated by the author and based on the data published by Cornelis (2010) and Felek et al. (2010) shows how polyadhesins may act in concert with the *Yersinia* type III secretion injectisome

minimally. Pla-mediated Yop translocation was independent of protease activity. Of the three single mutants, the Δail mutant was most defective for mouse virulence. Expression of *ail* was also the highest of the three adhesins in infected mouse tissues. When compared to an *ail* mutant, additional deletion of *psaA* (encoding Psa) led to a 130,000-fold increase in LD₅₀ in mice relative to the KIM5 parental strain. These results indicate that Psa can serve as environmentally-specific adhesin to facilitate Yop secretion, a critical virulence function of *Y. pestis*. Figure 5 shows a possible common mechanism of polyadhesins action in concert with the *Yersinia* type III secretion injectisome.

4.2. Binding of Polyadhesins to Host-Cell Receptors and Serum Proteins

4.2.1. Afa/Dr polyadhesins

Afa/Dr polyadhesins Dr, F1845 (DaaE), NFA-I and AfaE-III adhesins allow binding to the Dra blood-group antigen presented on the CD55/decay-accelerating factor (DAF), a complement-regulatory and signaling molecule (Nowicki et al., 1988). Under physiological conditions, CD55/DAF plays a central role in preventing the amplification of the complement cascade on host-cell surfaces (Fujita et al., 1987; Lublin & Atkinson, 1989). CD55/DAF interacts directly with membrane-bound C3b or C4b and prevents the subsequent uptake of C2 and factor B. Human CD55/DAF is a cell-associated protein with a Mr of 55 000–70 000 depending on its glycosylation level. Membrane-bound CD55/DAF is attached to the cell surface membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor (Caras et al., 1987; Davitz et al., 1986) attached to a serine–threonine–proline-rich region, followed by four repeating domains (Carroll et al., 1988; Rey-Campos et al., 1988). They are currently known as complement control protein repeat (CCP) domains, and were originally known as short consensus repeats (Servin, 2005; Le Bouguéneec & Servin, 2006). Removal of CCP-1 has no effect on CD55/DAF function, but individual deletion of CCP-2 and CCP-3 or CCP-4 totally abolished it (Coyne et al., 1992; Brodbeck et al., 1996). Afa/Dr adhesins recognize CCP-3 on CD55/DAF (Nowicki et al., 1993). Indeed, a single-point substitution in CCP-3 (Ser155 to Leu) causes complete abolition of adhesin binding to CD55/DAF (Nowicki et al., 1993). Dr adhesin-binding and complement-regulating epitopes of CD55/DAF appear to be distinct and are approximately 20 Å apart (Hasan et al., 2002). The amino acids Gly159, Tyr160 and Leu162 also aid in binding adhesin Dr, while residues Phe123 and Phe148 at the interface of CCP-2 and CCP-3, and also Phe154 in the CCP-3 cavity, are important in complement regulation. An atomic resolution model for functions of AfaE-III adhesin revealed the pivotal role of CCP-2 and CCP-3 in binding of adhesins onto CD55/DAF (Anderson et al., 2004a). At the same time, the residues of AfaE-III adhesin involved in CD55/DAF binding were localized (Fig. 6; Anderson et al., 2004a). Like DraE, AfaE-III binds to CCP-2 and CCP-3, but CCP-3 contributes most to the free energy of binding. The binding regions for AfaE-III and the complement pathway convertases lie in close proximity to each other on CD55/DAF. Binding of adhesin Dr to CD55/DAF is inhibited by chloramphenicol, whereas binding of AfaE-III is unaffected (Nowicki et al., 1988; Westerlund et al., 1989). This was used to locate the DraE adhesive site. The 3D structure of the strand-swapped trimer of wild-type DraE in complex with chloramphenicol was solved.

NMR data supported the binding position of chloramphenicol within the crystal (Anderson et al., 2004b; Pettigrew et al., 2004). Chloramphenicol binds to a surface pocket between the N-terminal portion of strand B and the C-terminal portion of strand E and lies within the recently identified CD55/DAF-binding site (Fig. 6; Anderson et al., 2004a). Pettigrew et al. (2009) reported X-ray structures of DraE bound to two chloramphenicol derivatives: chloramphenicol succinate (CLS) and bromamphenicol. The CLS structure demonstrates that acylation of the 3-hydroxyl group of CLM with succinyl does not significantly perturb the mode of binding while the bromamphenicol structure implies that the binding pocket is able to accommodate bulkier substituents on the N-acyl group. It is concluded that modifications of the 3-hydroxyl group would generate a potent hemagglutinin Dr inhibitor that would not cause the toxic side effects that are associated with the normal bacteriostatic activity of CLM.

Korotkova et al. (2006b) solved the 3D structure of DaaE at resolution 1.48Å. Trimers of the protein were found in the crystal, as has been the case for other adhesins Dr. Naturally occurring variants and directed mutations in DaaE have been generated and analyzed for their ability to bind CD55/DAF. Mapping of the mutation sites onto the DaaE molecular structure shows that several of them contribute to a contiguous surface that is likely the primary CD55/DAF-binding site (Fig. 6).

Dr, F1845 (DaaE) and AfaE-III adhesins also interact with carcinoembryonic antigen (CEA)-related cellular adhesion molecules CEACAM1, CEACAM5 and CEACAM6 (Berger et al., 2004). This recognition is followed by activation of CEACAMS-associated signaling by pathogens triggering the cellular events. CEACAM1, CEACAM5 and CEACAM6 belong to the immunoglobulin superfamily of adhesion molecules (Grunert & Kuroki, 1998; Hammarstrom, 1999; Öbrink, 1997; Thompson et al., 1991). They share a conserved N-terminal immunoglobulin variable-like domain that is followed by three, six and two immunoglobulin constant-like domains, respectively. CEACAM1 is inserted into the cellular membrane via C-terminal transmembrane and cytoplasmic domains, whereas CEACAM5 and CEACAM6 have a glycosylphosphatidylinositol anchor. The CEACAMS family generally functions as intercellular adhesion molecules (Benchimol et al., 1989), and could play a role in innate immunity (Fahlgren et al., 2003). CEACAM1 has been shown to be expressed in leukocytes, including granulocytes, activated T cells, B cells and natural killer cells (Grunert & Kuroki, 1998). CEACAM1 acts as a novel class of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing regulatory molecules on T cells that are active during the early phases of the immune response in mice (Benchimol et al., 1989; Kammerer et al., 1998, 2001; Nakajima et al., 2002; Fahlgren et al., 2003). The intracytoplasmic domain,

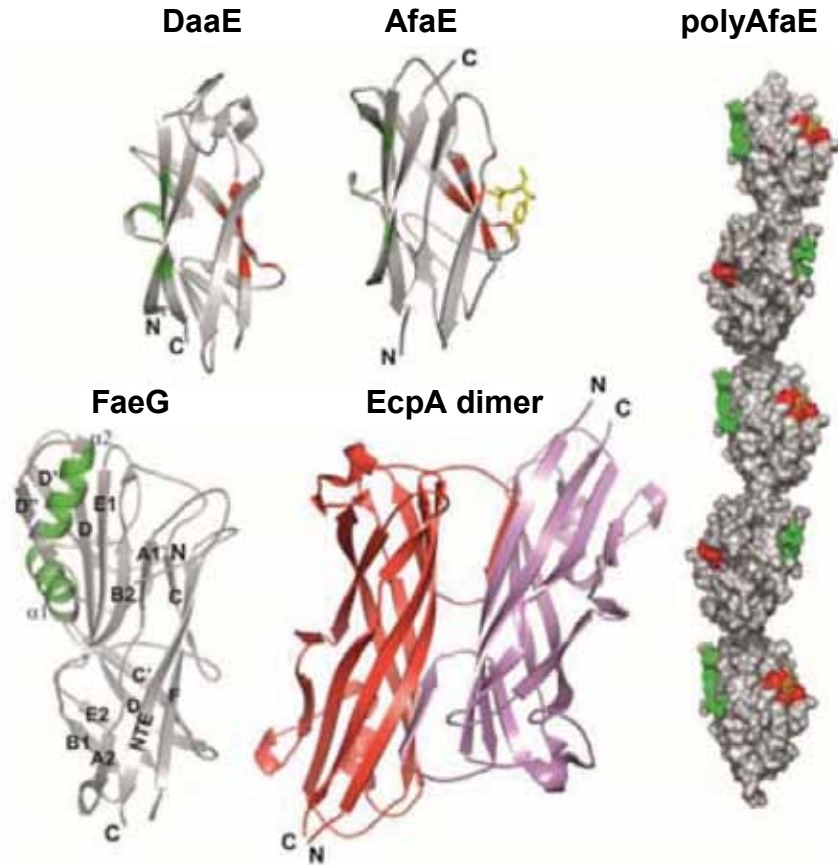


Fig. 6. Binding sites of FGL chaperone-assembled polyadhesin subunits *DaaE* and *AfaE*, FGS chaperone-assembled polyadhesin subunit *FaeG* and alternative chaperone-assembled polyadhesin subunit *EcpA*. Ribbon diagrams presentations of the *DaaE* subunit of a strand-swapped trimer of wild-type *DaaE* of F1845 adhesin and a self-complemented *AfaE* subunit of AFA-III adhesin with chloramphenicol as a yellow stick presentation. CD55/DAF- and CEACAMS-binding sites derived from *DraE* and *DaaE* mutagenesis are shown in green and red, respectively. Molecular surface rendering of a model for the *AfaE* fiber was generated by assuming the same orientation between successive subunits as observed for *CafI'* and *CafI''* in the F1 fiber (Zavialov et al., 2003). The residues involved in binding with CD55/DAF and CEACAMS are in green and red, respectively. The binding site in *FaeG* is shown by green. The redrawing is based on the data and coordinates of atoms of the structures published by Anderson et al. (2004a, b); Korotkova et al. (2006a, b); Pettigrew et al. (2004); Van Molle et al. (2007, 2009); Garnett et al. (2012). The figures were prepared with PYMOL (DeLano, 2002)

which contains two immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-like domains, is required for activation of a fraction of T cells in Lamina propria that express CEACAM1 by interleukin (IL)-7 and IL-15, indicating that CEACAM1 amplifies T-cell activation and thus could facilitate cross-talk between epithelial cells and T lymphocytes in the intestinal immune response (Donda et al., 2000). The particular role of CEACAM1 in *Neisseria* pathogenicity has been documented. *Neisseria gonorrhoeae* evades host immunity by switching off T lymphocytes (Bradbury, 2002). In *N. gonorrhoeae*, the Opa52 protein is able to bind CEACAM1 expressed by primary CD41 T lymphocytes and to suppress their activation and proliferation after the Opa gonococcal protein associates with the tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in the ITIM of CEACAM1 (Chen et al., 2001; Boulton & Gray-Owen, 2002). Rougeaux et al. (2008) found that, as Opa, the adhesin Dr induces the Tyr-phosphorylation of ITIM and ITSM and the recruitment of Shp-2. The review by Nouvion & Beauchemin (2009) summarized multiple functions of CEACAM1. It was shown that this multifunctional protein plays a role in intercellular adhesion, as an inhibitor of tumor development, as a bacterial adhesin and as a receptor for the mouse hepatitis virus. Moreover, CEACAM1 is an active regulator of cell signaling, modulating the insulin or EGF receptor pathways in epithelial cells or the Zap-70 pathway in hematopoietic cells. The recent development of genetically modified mouse models altering the Ceacam1 gene corroborates most of these data, but also highlights the functional complexity of CEACAM1. Thus, in addition to the functions identified previously, CEACAM1 is an important regulator of lipid metabolism, of tumor progression as a regulator of the Wnt signaling pathway, of normal and tumor neo-angiogenesis and of immunity (Nouvion & Beauchemin, 2009). Random mutagenesis with functional analysis and chemical shift mapping by NMR show a clear-cut CEACAMS binding site located primarily in the A, B, E and D strands of the adhesin Dr subunit (Fig. 6; Korotkova et al., 2006a). This site is located opposite the β -sheet encompassing the previously determined binding site for CD55/DAF, which implies that the polyadhesin Dr can bind simultaneously to both receptors on the epithelial cell surface. The structure of the CEA/Dr adhesin complex was proposed based on NMR spectroscopy and mutagenesis data in combination with biochemical characterization (Korotkova et al., 2008a, b). The Dr adhesin/CEA interface overlaps appreciably with the region responsible for CEA dimerization. Binding kinetics, mutational analysis and spectroscopic examination of CEA dimers suggest that adhesins Dr can dissociate CEA dimers before the binding of monomeric forms (Korotkova et al., 2008a, b). Hemagglutinin Dr is unique in the Afa/Dr adhesin family because it binds specifically to the 7S domain (tetramer) of the basement membrane protein

type IV collagen that is inhibited by the presence of chloramphenicol (Nowicki et al., 1988; Westerlund et al., 1989; Westerlund & Korhonen, 1993). Site-directed mutagenesis has been used to show that a negatively charged amino acid is required at position 54 of adhesive subunit Dr to confer chloramphenicol sensitivity of binding and that mutations at positions 32, 40, 54, 90 and 113 have different effects on type IV collagen binding and the chloramphenicol sensitivity of binding (Carnoy & Moseley, 1997). In particular, replacement of a single amino acid at position 113 of the DraE subunit results in loss of type IV collagen binding. Moreover, the two conserved Cys of the Afa/Dr family structural subunits form a disulfide bond, and mutations of these residues abolish both hemagglutination and binding to type IV collagen. Together with fibronectin, laminin, tenascin and heparin sulfate proteoglycans, type IV collagen is a component of the basement membrane, which is involved in complex interactions at the epithelial–mesenchymal interface. In particular, type IV collagen interacts with integrins expressed at the basal domain of polarized cells (Beaulieu, 1999) to form a link between the basement membrane and epithelial cells (Louvard et al., 1992). However, during inflammation, deregulated expression of membrane-bound molecules that are normally segregated in the basolateral domain of polarized intestinal cells occurs, and it is possible that in this context, type IV collagen binding may contribute to the pathogenic action of Afa/Dr adhesins (Selvarangan et al., 2004; Servin, 2005).

4.2.2. pH6 (Psa) polyadhesin

Liu et al. (2006) found by flow cytometry that individual *Y. pestis* cells can express the capsular F1 antigen concomitant with the pH6 antigen (Psa) on their surface when analyzed. To better evaluate the separate effects of F1 and Psa on the adhesive and invasive properties of *Y. pestis*, isogenic Δcaf (F1 genes), Δpsa and $\Delta caf\Delta psa$ mutants were constructed and studied with the three respiratory tract epithelial cells. The Δpsa mutant bound significantly less to all three epithelial cells compared with the parental wild-type strain and the Δcaf and $\Delta caf\Delta psa$ mutants, indicating that the pH6 antigen acts as an adhesin for respiratory tract epithelial cells. An antiadhesive effect of the F1 antigen was clearly detectable only in the absence of the pH6 antigen, underlining the dominance of the Psa⁺ phenotype. Both F1 and pH6 antigens inhibited the intracellular uptake of *Y. pestis*. Thus, F1 inhibits bacterial uptake by inhibiting bacterial adhesion to epithelial cells, whereas the pH6 antigen seems to block bacterial uptake by interacting with a host receptor that controls the direct internalization. The $\Delta caf\Delta psa$ double-mutant bound and invaded all three epithelial cell types well, indicating the presence of undefined adhesin(s) and invasin(s).

It was found that the pH6 antigen of *Y. pestis* is a novel bacterial immunoglobulin G (IgG)-binding receptor (Zav'yalov et al., 1996). A pseudoimmune complex with human IgG1, IgG2 and IgG3 was formed. No binding to human IgG4, rabbit, mouse or sheep IgG was found. Antigen pH6 binds the human IgG1 Fc subunit and does not bind Fab and pFc' subunits. This finding may be explained by pH6 antigen binding to the β 1-linked galactosyl residue (Payne et al., 1998) in a carbohydrate moiety of human IgG1, IgG2 and IgG3 that is linked to C_H2 domains of their Fc subunit (Deisenhofer, 1981).

Purified pH6 antigen selectively binds to apolipoprotein B-containing lipoproteins (low-density lipoproteins) in human plasma (Makoveichuk et al., 2003). Low-density lipoproteins at a normal physiological concentration in human blood (equal to $\sim 250 \mu\text{g mL}^{-1}$) nearly abolish the interaction of purified pH6 antigen with macrophages. This process could prevent the recognition of a pathogen by the host immune defense system (Makoveichuk et al., 2003). Such immune masking could be important for the ability of the pathogen to cause disease (Makoveichuk et al., 2003).

Binding of purified recombinant pH6 antigen to gangliotetraosylceramide, gangliotriaosylceramide and lactosylceramide was indicated by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Payne et al., 1998). The binding was saturable, with 50% of maximal binding occurring at 498, 390 and 196 nM, respectively. Intact *E. coli* cells that expressed the pH6 antigen had specificity similar to the purified pH6 antigen of *Y. pestis* on thin-layer chromatography, except that nonhydroxylated galactosylceramide was also bound. The binding pattern indicates that the presence of the β 1-linked galactosyl residue in glycosphingolipids is the minimum requirement for binding of the pH6 antigen.

It was found that pH6 (Psa) antigen fimbriae mediate bacterial binding to human alveolar epithelial cells (Galván et al., 2006). The pH6 fimbriae bound mostly to one component present in the total lipid extract from type II alveolar epithelial cells A549. The receptor of the pH6 antigen was identified as phosphatidylcholine by thin-layer chromatography, molybdenum blue staining and pH6 antigen overlays. The pH6 antigen fimbriae bound to phosphatidylcholine in a dose-dependent manner, whereas the binding was inhibited by phosphorylcholine and choline. Antigen pH6 also bound to the pulmonary surfactant, which covers the alveolar surface as a product of type II alveolar epithelial cells and includes phosphatidylcholine as the major component. The observed dose-dependent interaction of the pH6 antigen with the pulmonary surfactant was blocked by phosphorylcholine. Interestingly, the surfactant did not inhibit pH6 antigen-mediated bacterial binding to alveolar cells, suggesting that both the surfactant and cell membrane phosphatidylcholine retain pH6 antigen-fimbriated bacteria on

the alveolar surface. Altogether, the results indicate that the pH6 antigen uses the phosphorylcholine moiety of phosphatidylcholine as a receptor to mediate bacterial binding to pulmonary surfactant and alveolar epithelial cells.

It was directly demonstrated that Psa fimbriae (pH6 antigen) of *Y. pestis* function as polyadhesins (Galván et al., 2006). The Psa fimbriae bound to phosphatidylcholine in a dose-dependent manner and binding was inhibited by phosphorylcholine and choline. Binding inhibition was dose-dependent, although only high concentrations of phosphorylcholine completely blocked Psa binding to phosphatidylcholine. In contrast, less than 1 μM of a phosphorylcholine–polylysine polymer inhibited specifically the adhesion of Psa-fimbriated *E. coli* to phosphatidylcholine, type I (WI-26 VA4) and type II alveolar epithelial cells. Figure 7 illustrates polyadhesive binding of Psa-fimbriated *Y. pestis* to alveolar epithelial cells and macrophages.

The crystal structure of PsaA in complex with both galactose and phosphocholine reveals separate receptor binding sites that share a common structural motif, thus suggesting a potential interaction between the two sites (Bao et al., 2013). Mutagenesis of this shared structural motif identified Tyr126, which is part of the choline-binding consensus sequence

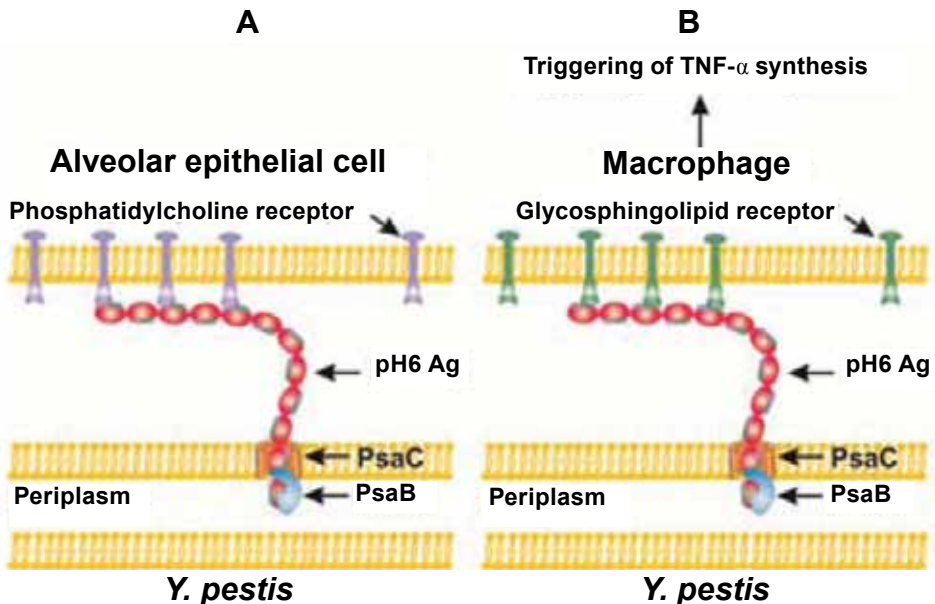


Fig. 7. The drawing elaborated by the author and based on the data published by Galván et al. (2006) and Payne et al. (1998) shows how Psa-fimbriated *Y. pestis* may be attached with pH6 (Psa) polyadhesin to alveolar epithelial cells and macrophages

but is found in direct contact with the galactose in the structure of PsaA, important for both receptor binding. Thus, this structure depicts a fimbrial subunit that forms a polymeric adhesin with a unique arrangement of dual receptor binding sites.

4.2.3. F4 (K88) polyadhesin

Enterotoxigenic *E. coli* expressing F4 (K88) fimbriae are the major cause of porcine colibacillosis and are responsible for significant death and morbidity in neonatal and postweaned piglets. F4 fimbriae are assembled into thin, flexible polymers mainly composed of the single-domain adhesin FaeG (van den Broeck et al., 2000; Van Molle et al., 2007, 2009). FaeG has an Ig core made up of strands A1, A2, B1, B2, C, D, E1, E2, F and G, named according to their place in the Ig-fold and in analogy to the nomenclature used for other fimbrial subunit structures (Fig. 6; Van Molle et al., 2007, 2009). These show an incomplete Ig-like structure, lacking the last β -strand G. In pili, this G-strand is provided by the Nte of the adjacent subunit. In the Ig fold of the FaeG, a short helical turn occurs between strands A2 and B1, and an extra strand C' is inserted between strands C and D. In addition to the Ig-folded core, the FaeG structure contains an extra domain introduced between strands D and E1. This domain is composed of strands D' and D'', linked by two α -helices, $\alpha 1$ and $\alpha 2$.

Bakker et al. (1991) described the receptor binding site on FaeG as a spatial arrangement of two amino acid residues with a hydrophobic side-chain (Phe/Leu134 and Phe/Leu/Met147) in combination with one or more amino acid residues with hydrophilic and charged side-chains (Lys/Arg136, Arg/Ser/His155 and Asp/Asn216, or in the hypervariable region comprised of residues 163–173). The structure of FaeG allowed Van Molle et al. (2007) to localize the aforementioned residues and the hypervariable regions comprising residues 163–173 and residues 206–216 on the surface of FaeG (Fig. 6, shown by green). This suggests that the receptor-binding site of FaeG is not located within the Ig core of the protein but rather in the extra domain made up of strands D' and D'', and α -helices $\alpha 1$ and $\alpha 2$. Especially the long loop between D' and $\alpha 1$ and the loop connecting the extra domain to the Ig core (between D'' and E1) are indicated as being part of the binding site.

4.2.4. ECP polyadhesin

The first data on a novel fimbria isolated at low temperatures from *E. coli* associated with newborn meningitis and septicaemia (NMEC) were published by Pouttu et al. (2001). This surface organelle was called the meningitis associated and temperature regulated (Mat) fimbria, although

later by other groups was shown that this fibrillar organelle is ubiquitous across most *E. coli* strains and it is now usually referred to as the *E. coli* common pilus (ECP) (Avelino et al., 2010; Blackburn et al., 2009; Rendon et al., 2007; Saldana et al., 2009). *E. coli* are primarily commensal colonizers of the human and other animal bowels and they contribute to a healthy immune system of the host. There are also a number of virulent strains that can cause diarrheal diseases such as hemorrhagic colitis (Croxen & Finlay, 2010). Furthermore, if they enter extraintestinal sites these strains can also lead to neonatal meningitis, urinary tract infections, sepsis, and pneumonia (Picard et al., 1999).

ECP fibres are assembled via the alternative CU pathway and the organelles are formed from polymerization of two pilin subunits (Fig. 3F and G) (Garnett et al., 2012). The tip of ECP is uniquely composed from a polymerized array of a novel 60 kDa adhesive subunit EcpD which recognizes an unknown ligand on the host cell surface (Garnett et al., 2012). The majority of ECP is composed of an 18 kDa domain called EcpA (Pouttu et al., 2001; Rendon et al., 2007), which functions in binding hydrophobic surfaces and mediating interbacterial aggregation in early biofilm formation (Garnett et al., 2012; Lehti et al., 2010).

The crystal structure of EcpA from uropathogenic *E. coli* has been recently solved (Fig. 6; Garnett et al., 2012; PDB: 3QS2, 3QS3). Like other CU major pilin domains, EcpA is formed from an incomplete Ig-like fold, where an adjacent molecule in the fiber donates its N-terminal strand (N-terminal extension) to fill a hydrophobic groove running along the full length of EcpA, completing the very stable Ig-like motif (Fig. 6). EcpA is fashioned from approximately 50% hydrophobic residues and the surface is scattered with hydrophobic patches including a number of aromatic residues. This likely promotes a less-specific contact with a wide range of hydrophobic substrates and polymers.

ECP are quite flexible with a width ~6 nm, which consistently varies along the fibre length (Fig. 3 F; Garnett et al., 2012). Electron microscopy images of *E. coli* producing ECP show these fibres form a mesh that encapsulates the whole microcolony. ECP interacts with itself through pili crossing over one another, parallel fibre entwining and antiparallel entwining (Garnett et al., 2012). The crystal lattice of EcpA also revealed an intertwining of antiparallel fibres giving rise to a super helical diameter of ~12 nm. EcpA is highly conserved amongst a range of other enteric bacterial species including *Serratia proteamaculans*, *Serratia odorifera*, *Klebsiella* sp., *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cancerogenus*, which suggests a role for ECP in establishing contacts between multiple species (Garnett et al., 2012).

4.2.6. Capsular F1 antigen

It was found that human IL-1 β specifically binds to a protein of the *caf* operon, expressed on the surface of the recombinant *E. coli* strain (Zav'yalov et al., 1995a). The binding was specifically inhibited by the Caf1M–Caf1 complex, but not by the free Caf1M chaperone. Partially purified Caf1A also demonstrated binding with human IL-1 β . The contradiction between the results can be explained by the presence of an admixture of the Caf1M–Caf1 complex in the Caf1A sample. Indeed, it has been demonstrated that the chaperone–subunit complex is copurifying in complex with usher protein (Nishiyama et al., 2005). Figure 8 shows the specific saturable binding of the Caf1 subunits depolymerised by heating of the capsular F1 antigen to immobilised human IL-1 β . The binding of the Caf1 subunits to human IL-1 α was significantly lower. No significant binding of the Caf1 subunits to human IL-1ra was observed as well as to the human IL-4 and BSA (control).

4.5. Contribution of Polyadhesins to Bacterial Virulence

4.5.1. pH6 (Psa) antigen

The pH6 antigen was first described >40 years ago and was initially identified as an antigen expressed only at a pH below 6 at 37 °C (Ben-Efraim et al., 1961). The electron micrographs of highly virulent phenotype

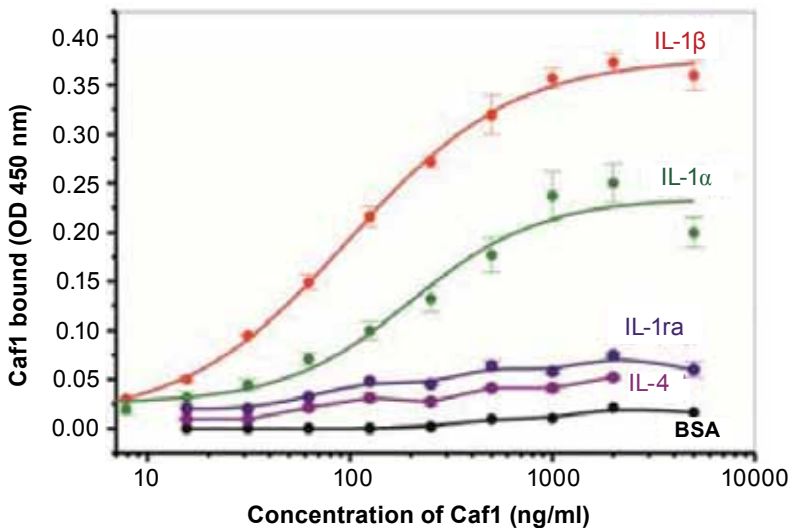


Fig. 8. The binding of the Caf1 subunits depolymerised by heating of the capsular F1 antigen to immobilised human IL-1 β , - α and -ra is shown (Zav'yalov, 2012). Human IL-4 and BSA were used as the control

Y. pestis grown at 37 °C, pH 6, indicate the expression of both the F1 capsule and thin filaments of the pH6 (PsaA) antigen on the bacterial surface (Lindler & Tall, 1993). The pH6 antigen is essential for full virulence of *Y. pestis* (Lindler et al., 1990; Lindler & Tall, 1993). A Δ *psaA* mutant had a significant dissemination defect after subcutaneous infection, but only slight attenuation by the pneumonic-disease model, indicating different roles of the pH6 antigen in bubonic and pneumonic plague (Cathelyn et al., 2006). The expression of the pH6 antigen adds to the antiphagocytic armament of the bacterium (Huang & Lindler, 2004). *Y. pestis* *psaA* isogenic strains do not show any significant difference in their association with mouse macrophage cells. However, expression of *psaA* appeared to reduce significantly phagocytosis of both *Y. pestis* and *E. coli* by mouse macrophages ($P < 0.05$). Furthermore, complementation of the *psaA* mutant of *Y. pestis* strains could completely restore the bacterial resistance to phagocytosis. Fluorescence microscopy following differential labeling of intracellular and extracellular portions of *Y. pestis* revealed that significantly lower numbers of *psaA*-expressing bacteria were located inside the macrophages. Enhanced phagocytosis resistance was specific for bacteria expressing *psaA* and did not influence the ability of the macrophages to engulf other bacteria. This shows that *Y. pestis* pH6 antigen does not enhance adhesion to macrophages, but rather promotes resistance to phagocytosis, helping the bacteria to escape host immune defense mechanisms (Huang & Lindler, 2004).

4.5.2. Capsular F1 antigen

Y. pestis is the etiologic agent of bubonic and pneumonic plague, one of the most deadly diseases known to humans (Cleri et al., 1997; Li et al., 2009a, b; Perry & Fetherston, 1997; Smiley, 2008a, b; Williamson, 2009). Before the era of antibiotics it caused 100% mortality. Pandemic plague killed about 200 million people or more than all wars in the history of mankind.

Electron micrographs of *Y. pestis* demonstrate that the F1 antigen-forming capsule is maximally expressed at 37 °C after 72 h of cultivation *in vitro* (Chen & Elberg, 1977; Runco et al., 2008). The expression of F1 antigen at 22 °C is negligible (Chen & Elberg, 1977). During the early stages of infection, when the F1 capsule is not yet formed, the type III secretion system protects *Y. pestis* from phagocytosis (Cornelis & Wolf-Watz, 1997; Viboud & Bliska, 2005). This system is encoded on a virulence plasmid 70 kb in size that is common to *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*. After 24 h of cultivation *in vitro* at 37 °C, *Y. pestis* expresses a large capsule-like structure composed of an aggregating F1 antigen (Chen & Elberg, 1977; Runco et al., 2008). The capsule material is readily solu-

ble and dissociates from the bacterium during *in vitro* cultivation. The association of the F1 antigen with virulence is evident from the studies demonstrated that all F1⁻ mutants were of low virulence to mice compared with the wild types (Welkos et al., 2004). Similar to other capsules or capsule-like antigens, F1 seems to be involved in the antiphagocytic activity reported for *Y. pestis*, but the contribution of F1 to this activity was not understood until recently. *Y. pestis* strain EV76 is highly resistant to uptake by J774 cells (Du et al., 2002). *Y. pestis* strain EV76 with an in-frame deletion of the *cafIM* gene failed to express the F1 polymer on the bacterial surface. This strain had a somewhat reduced ability to prevent uptake by J774 cells. Strain EV76C, cured with the virulence plasmids, was much reduced in its ability to resist uptake. A strain lacking both the virulence plasmid and *cafIM* was almost totally phagocytosed (95%; Du et al., 2002). It was concluded that F1 and the type III secretion system act in concert to make *Y. pestis* highly resistant to phagocytosis. The type III secretion system of *Y. pestis* may function optimally only during the early stages of infection, when the contact-dependent delivery of Yop effector proteins is the highest. Later on, when the surface of *Y. pestis* is covered with the F1 capsule, the delivery of Yop effector proteins may be lower. Although the expression of F1 capsule reduces the number of bacteria that interact with the macrophages, it does not influence the general phagocytic ability of J774 cells (Du et al., 2002). This suggests that the F1 capsule prevents uptake by interfering at the level of receptor interaction in the phagocytosis process. Sebbane et al. (2009) found that a *caf*⁻ *Y. pestis* mutant was not impaired either in flea colonization or in virulence in mice after intradermal inoculation of cultured bacteria. In contrast, absence of the *caf* operon decreased bubonic plague incidence after fleabite. Successful development of plague in mice infected by fleabite with the *caf* mutant required a higher number of infective bites per challenge. In addition, the mutant displayed a highly autoaggregative phenotype in infected liver and spleen. The results suggest that acquisition of the *caf* locus via horizontal transfer by an ancestral *Y. pestis* increased transmissibility and the potential for epidemic spread. Sebbane et al. (2009) suggested a model in which atypical *caf*⁻ strains could emerge during climatic conditions that favor a high flea burden. Human infection with such strains would not be diagnosed by the standard clinical tests that detect F1 antibody or antigen, suggesting that more comprehensive surveillance for atypical *Y. pestis* strains in plague foci may be necessary.

Y. pestis survives and replicates in phagosomes of murine macrophages. *Y. pestis*-containing vacuoles (YCVs) acquire markers of late endosomes or lysosomes in naïve macrophages and these bacteria can survive in macrophages activated with interferon- γ . An autophagic process known as

xenophagy, which destroys pathogens in acidic autophagolysosomes, can occur in naïve macrophages and is upregulated in activated macrophages. Studies on the mechanism of *Y. pestis* survival in phagosomes of naïve and activated macrophages were undertaken to determine whether the pathogen avoids or co-opts autophagy. Colocalization of the YCV with markers of autophagosomes or acidic lysosomes and the pH of the YCV were determined by microscopic imaging of infected macrophages (Pujol et al., 2009). Some YCVs contained double membranes characteristic of autophagosomes, as determined by electron microscopy. Fluorescence microscopy showed that approximately 40% of YCVs colocalized with green fluorescent protein (GFP)-LC3, a marker of autophagic membranes, and that YCVs failed to acidify below pH 7 in naïve macrophages. Replication of *Y. pestis* in naïve macrophages caused accumulation of LC3-II, as determined by immunoblotting. Whereas activation of infected macrophages increased LC3-II accumulation, it decreased the percentage of GFP-LC3-positive YCVs (approximately 30%). A viable count assay showed that *Y. pestis* survived equally well in macrophages proficient for autophagy and macrophages rendered deficient for this process by Cre-mediated deletion of *ATG5*, showing that this pathogen does not require autophagy for intracellular replication. Pujol et al. (2009) concluded that although YCVs can acquire an autophagic membrane and accumulate LC3-II, the pathogen avoids xenophagy by preventing vacuole acidification.

Recently Weening et al. (2011) demonstrated that *Y. pestis* requires both *PsaA* and *CafI* to achieve its full pathogenic ability in both pneumonic and bubonic plague models in C57BL/6J mice. Deletion of *psaA* leads to a decrease in the organ bacterial burden and to a significant increase in the 50% lethal dose (LD_{50}) after subcutaneous infection. The LD_{50} of the $\Delta psaA$ mutant strain was 400-fold higher than that of the wild type. Deletion of *cafI* also leads to a significant decrease in the organ bacterial burden but more importantly leads to a significantly greater increase in the LD_{50} than was observed for the $\Delta psaA$ mutant strain after subcutaneous infection of C57BL/6J mice. The LD_{50} of the $\Delta cafI$ mutant strain is more than 100,000-fold greater than that of the wild type (Weening et al., 2011). Furthermore, the degree of attenuation of the $\Delta cafI$ mutant strain is mouse background dependent, as the $\Delta cafI$ mutant strain was attenuated to a lesser degree in BALB/cJ mice by the subcutaneous route than in C57BL/6J mice. This observation that the degree of requirement for *CafI* is dependent on the mouse background indicates that the virulence of *Y. pestis* is dependent on the genetic makeup of its host and provides further support for the hypothesis that *PsaA* and *CafI* have different targets.

4.6. Triggering of Proinflammatory Responses by Polyadhesins

4.6.1. Capsular F1 antigen

Fragments of the recombinant F1 capsule of *Y. pestis* scattered into cultural media activate mice peritoneal macrophages *in vitro* (Sodhi et al., 2004). The fragments of the F1 capsule induce the production of proinflammatory cytokines, TNF- α , IL-1 and IL-6. The activation suggests the involvement of nuclear factor (NF)- κ B and MAPK pathways (Sodhi et al., 2004; Sharma et al., 2005a, b). Whereas IL-1 β and F1 stimulate macrophages to produce various proinflammatory mediators via the same pathway (Kida et al., 2005), *Yersinia* virulence factor, YopJ, which is essential for the death of infected macrophages, can block host proinflammatory responses by inhibiting both NF- κ B and MAPK pathways (Zhou et al., 2005). Lemaitre et al. (2006) confirmed that YopJ suppresses TNF- α induction and contributes to apoptosis of immune cells in the lymph node, but is not required for virulence in a rat model of bubonic plague. Thus, during the early stage of infection, the type III secretion system and short nonaggregated F1 antigen act in concert: the former inhibits the produc-

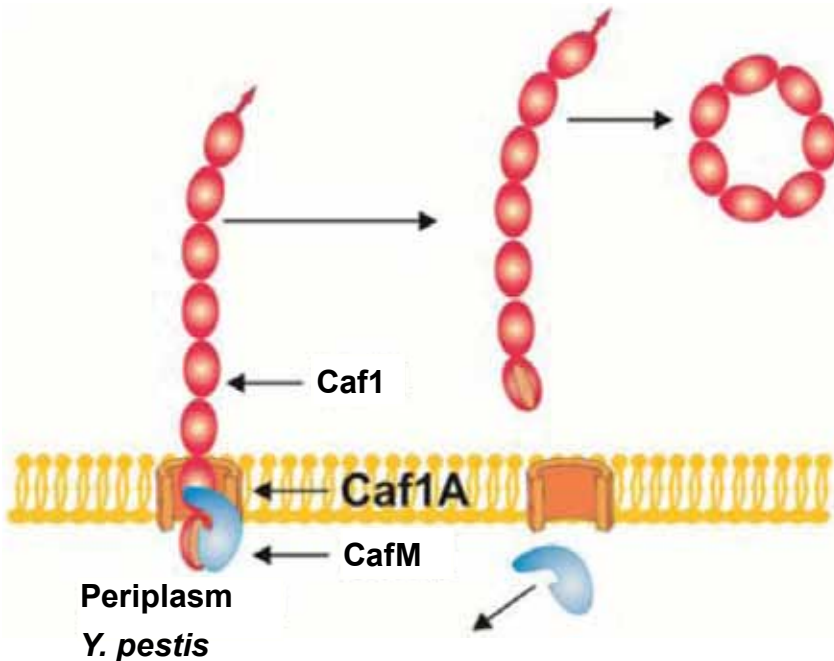


Fig. 9. The drawing elaborated by the author and based on the data published by Soliakov et al. (2010) shows a possible mechanism of circularization of rCaf1 polymers scattered into cultural media

tion of proinflammatory cytokines and the latter inhibits binding of IL-1 β to the host cell receptors. However, at the final stage of systemic infection, fragments of the recombinant F1 capsule of *Y. pestis* scattered into cultural media from the disseminated bacteria can induce a suicidal proinflammatory response, contributing to toxic shock and death of the host.

Soliakov et al. (2010) revealed with electron microscopy that fragments of the recombinant F1 capsule of *Y. pestis* scattered into cultural media form predominantly circularized rCaf1 polymers which has probably formed a closed loop by donor strand exchange. Circularization appears to be length dependent and for shorter fibres with the predominant length around 125 nm. Figure 9 shows a possible mechanism of circularization of rCaf1 polymers scattered into cultural media.

Sebbane et al. (2006) demonstrated that high NO levels induced during plague may also influence the developing adaptive immune response and contribute to septic shock.

4.6.2. pH6 (Psa) antigen

Figure 10 shows that pH6 (Psa) antigen specifically triggers TNF- α synthesis by HL-60 cells and may also contribute to septic shock as a result of suicidal proinflammatory response.

CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

Among the bacterial causes, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), *E. coli* strains producing enterotoxins, are the most common cause of diarrheal disease in children living in endemic areas, as well as children and adults traveling to these areas. Approximately 280–400 million ETEC-associated diarrhea cases occur annually in children younger than 5 years old, plus 100 million more cases in children older than 5 years, which results in approximately 300,000–500,000 deaths annually (Zhang & Sack, 2012). Although the highest rates and mortality occur in young children, ETEC illness is certainly not limited to children. Travelers are also susceptible to diarrhea as they are usually immunologically naive and are exposed to the environment in developing countries. Among the causes of traveler's diarrhea, ETEC is the most common. It was estimated that 400 million adult diarrheal cases are associated with ETEC (Zhang & Sack, 2012).

After half a century of highly productive antibiotic development, however, it has now become obvious that antibiotics cannot provide the ultimate solution in the fight against bacterial infections. The non-critical use of antibiotics in human and veterinary medicine has caused widespread resistance in bacteria. Antibiotic-resistant strains of Gram-negative pathogens have emerged extensively in the last dozen years, whereas safe and effective vaccines against many of them are currently not available. There are

now a growing number of reports of cases of infections caused by Gram-negative organisms for which no adequate therapeutic options exist (de Jong & Ekdahl, 2006; Giske et al., 2008). This return to the preantibiotic era has become a reality in Europe as well as in other parts of the world. A large outbreak of diarrhea and the hemolytic-uremic syndrome caused by an unusual serotype of Shiga-toxin-producing *E. coli* (O104:H4) occurred in Germany in 2011. A large number of cases of diarrhea caused by Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) have been reported - 3167 without the hemolytic-uremic syndrome (16 deaths) and 908 with the hemolytic-uremic syndrome (34 deaths) - indicating that this strain is notably more virulent than most of the STEC strains (Rasko et al., 2011). The pAA plasmid of C277-11 (referred to here as pAA C277-11) encodes the *agg* cluster responsible for expression of the aggregative adherence fimbriae Type I, AAF-I. The AAF-I fimbriae are related to the family of polyadhesins, subfamily 1.2: FGL chaperone-assembled polyadhesins-(1+1)-1 (Zav'yalov et al., 2010). The main subunit of the AAF-I fimbriae, AggA, together with the additional subunit AggB may be used for development of vaccine against this STEC strain. Among the most common protective antigens for design of vaccines against ETEC are the CS3 and CS6 polyadhesins. A key problem is the development of a vaccine that is both practical and inexpensive so that it can be affordable for use in poor countries where it is needed (Zhang & Sack, 2012).

Passive immunization has recently become an even more attractive approach because of individuals with impaired immune systems who are unable to respond to conventional vaccines. Also, passively administered antibodies have the ability to provide rapid and immediate protection. Antibacterial serum therapy is now being reinvented in modern biotechnology terms, in the form of monoclonal antibodies (Oleksiewicz et al., 2012). However, when considering antibody production for passive immunotherapy applications for treatment of enteric bacterial infections, chickens present a much more economical source of large quantities of specific antibodies (Schade et al., 2007). Chicken IgY yields have been reported to range from 60 to 150 mg IgY per egg (Cook & Trott, 2010, Pauly et al., 2009). Given that a typical hen can lay approximately 325 eggs per year, this can result in a potential yield of around 20–40 g of IgY per year (Pauly et al., 2009), of which 2% to 10% is antigen-specific (Schade et al., 1991, Tini et al., 2002).

IgY has been tested against a number of enteric pathogens. IgY produced against the porcine ETEC polyadhesins F4 (K88) and F5 (K99) was found to inhibit the binding of *E. coli* K88-, K99-positive strains to porcine epithelial cells (Yokoyama et al., 1992) and porcine intestinal mucus (Jin et al., 1998) *in vitro*. When given orally to piglets, these an-

tibodies dose-dependently protected against *E. coli* infection (Yokoyama et al., 1992). More recently, Li et al. (2009b) found that when anti-K88+ ETEC IgY was encapsulated in chitosan-alginate microparticles, it exerted its antidiarrheal effects much faster (24 h versus 72 h postinfection in pigs given nonencapsulated IgY) and led to increased weight gain when compared to pigs fed nonencapsulated antibodies. The passive protective effect of anti-*E. coli* IgY in cattle has also been shown. Neonatal calves fed milk containing anti-ETEC IgY had transient diarrhea, 100% survival, and improved body weight gain (Ikemori et al., 1992).

Thus, the polyadhesins are potential targets for immune countermeasures against bacterial infections, in particular for anti-adhesion therapy with antibodies to polyadhesins as one of alternatives to antibiotic therapy.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the European Commission/Research Executive Agency under a Marie Curie International Incoming Fellowship (235538) and a grant from the Academy of Finland (112900).

References

1. Adams L. M., Simmons C. P., Rezmann L. et al. Identification and characterization of a K88- and CS31A-like operon of a rabbit enteropathogenic and K99 fimbriae in enterotoxigenic *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. – 1997. – **5**. – P. 875–886.
2. Allen W. J., Phan G., Waksman G. Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens // Curr. Opin. Struct. Biol. – 2012. – **22**. – P. 1–7.
3. Ahrens R., Ott M., Ritter A. et al. Genetic analysis of the gene cluster encoding nonfimbrial adhesin I from an *Escherichia coli* uropathogen // Infect Immun. – 1993. – **61**. – P. 2505–2512.
4. Anderson K. L., Billington J., Pettigrew D. et al. An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesins // Mol. Cell. – 2004a. – **101**. – P. 647–657.
5. Anderson K. L., Cota E., Simpson P. et al. Complete resonance assignments of a 'donor-strand complemented' AfaE: the afimbrial adhesin from diffusely adherent *E. coli* // J. Biomol. NMR. – 2004b. – **29**. – P. 409–410.
6. Avelino F., Saldana Z., Islam S. et al. The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells // Int. J. Med. Microbiol. – 2010. – **300**. – P. 440–448.
7. Bakker D., Vader C. E. M., Roosendaal B. et al. Structure and function of periplasmic chaperone-like proteins involved in the biosynthesis of K88 and K99 fimbriae in enterotoxigenic *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. – 1991. – **5**. – P. 875–886.

8. Blackburn D., Husband A., Saldana Z. et al. Distribution of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli* // J. Clin. Microbiol. – 2009. – **47**. – P. 1781–1784.
9. Bann J. G., Pinkner J. S., Frieden C., Hultgren S. J. Catalysis of protein folding by chaperones in pathogenic bacteria // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – **101**. – P. 17389–17393.
10. Bao R., Nair M. K., Tang W. K. et al. Structural basis for the specific recognition of dual receptors by the homopolymeric pH 6 antigen (Psa) fimbriae of *Yersinia pestis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – **110**. – P. 1065–1070.
11. Beaulieu J. F. Integrins and human intestinal cell functions // Front Biosci. – 1999. – **4**. – P. D310–D321.
12. Benchimol S., Fuks A., Jothy S. et al. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule // Cell. – 1989. – **57**. – P. 327–334.
13. Ben-Efraim S., Aronson M., Bichowsky-Slomnicki L. New antigenic component of *Pasteurella pestis* formed under specific conditions of pH and temperature // J. Bacteriol. – 1961. – **81**. – P. 704–714.
14. Berger C. N., Billker O., Meyer T. F. et al. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC) // Mol. Microbiol. – 2004. – **52**. – P. 963–983.
15. Bork P., Holm L., Sander C. The immunoglobulin fold: structural classification, sequence patterns and common core // J. Mol. Biol. – 1994. – **242**. – P. 309–320.
16. Bouckaert J., Berglund J., Schembri M. et al. Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesion // Mol. Microbiol. – 2005. – **55**. – P. 441–455.
17. Bouckaert J., Mackenzie J., de Paz J. L. et al. The affinity of the FimH fimbrial adhesin is receptor-driven and quasi-independent of *Escherichia coli* pathotypes // Mol. Microbiol. – 2006. – **61**. – P. 1556–1568.
18. Boulton I. C., Gray-Owen S. D. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD41 T lymphocytes // Nat. Immunol. – 2002. – **3**. – P. 229–236.
19. Bradbury J. *Neisseria gonorrhoeae* evades host immunity by switching off T lymphocytes // Lancet. – 2002. – **359**. – P. 681.
20. Brodbeck W. G., Liu D., Sperry J. et al. Localization of classical and alternative pathway regulatory activity within the decay-accelerating factor // J. Immunol. – 1996. – **156**. – P. 2528–2533.
21. Busch A., Waksman G. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism // Phil. Trans. R Soc. B. – 2012. – **367**. – P. 1112–1122.
22. Cantey J. R., Blake R. K., Williford J. R., Moseley S. L. Characterization of the *Escherichia coli* AF/R1 pilus operon: novel genes necessary for transcriptional regulation and for pilus-mediated adherence // Infect Immun. – 1999. – **67**. – P. 2292–2298.
23. Caras I. W., Weddell G. N., Davitz M. A. et al. Signal for attachment of a phospholipid membrane anchor in decay accelerating factor // Science. – 1987. – **238**. – P. 1280–1283.

24. Carnoy C., Moseley S. L. Mutational analysis of receptor binding mediated by the Dr family of *Escherichia coli* adhesins // Mol. Microbiol. – 1997. – **23**. – P. 365–379.
25. Carroll M. C., Alicot E. M., Katzman P. J. et al. Organization of the genes encoding complement receptors type 1 and 2, decay-accelerating factor, and C4-binding protein in the RCA locus on human chromosome 1 // J. Exp. Med. – 1988. – **167**. – P. 1271–1280.
26. Cathelyn J. S., Crosby S. D., Lathem W. W. et al. RovA, a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**. – P. 13514–13519.
27. Chapman D. A. G., Zavialov A. V., Chernovskaya T. V. et al. Structure and functional significance of the FGL sequence of the periplasmic chaperone, Caf1M, of *Yersinia pestis* // J. Bacteriol. – 1999. – **181**. – P. 2422–2429.
28. Chen T., Zimmermann W., Parker J. et al. Biliary glycoprotein (BGP_a, CD66_a, CEACAM1) mediates inhibitory signals // J. Leukocyte Biol. – 2001. – **70**. – P. 335–340.
29. Chen T. H., Elberg S. S. Scanning electron microscopic study of virulent *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* type 1 // Infect. Immun. – 1977. – **15**. – P. 972–977.
30. Chessa D., Dorsey C. W., Winter M., Bäuml A. J. Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics // J. Biol. Chem. – 2008. – **283**. – P. 8118–8124.
31. Choudhury D., Thompson A., Stojanoff V. et al. X-ray structure of the FimC-FimH chaperone–adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli* // Science. – 1999. – **285**. – P. 1061–1066.
32. Cleri D. J., Vernaleo J. R., Lombardi L. J. et al. Plague pneumonia disease caused by *Yersinia pestis* // Semin. Respir. Infect. – 1997. – **12**. – P. 12–23.
33. Clouthier S. C., Collinson S. K., Kay W. W. Unique fimbriae-like structures encoded by *sefD* of the SEF14 fimbrial gene cluster of *Salmonella enteritidis* // Mol. Microbiol. – 1994. – **12**. – P. 893–901.
34. Cook M. E., Trott D. L. IgY: immune components of eggs as a source of passive immunity for animals and humans // World Poultr. Sci. J. – 2010. – **66**. – P. 215–225.
35. Cornelis G. R. The type III secretion injectisome, a complex nanomachine for intracellular ‘toxin’ delivery // Biol. Chem. – 2010. – **391**. – P. 745–751.
36. Cornelis G. R., Wolf-Watz H. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells // Mol. Microbiol. – 1997. – **23**. – P. 861–867.
37. Coyne K. E., Hall S. E., Thompson S. et al. Mapping of epitopes, glycosylation sites, and complement regulatory domains in human decay accelerating factor // J. Immunol. – 1992. – **149**. – P. 2906–2913.
38. Croxen M. A., Finlay B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – **8**. – P. 26–38.
39. Davitz M. A., Low M. G., Nussenzweig V. Release of decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC). Selective modification of a complement regulatory protein // J. Exp. Med. – 1986. – **163**. – P. 1150–1161.

40. *Deisenhofer J.* Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution // *Biochemistry*. – 1981. – **20**. – P. 2361–2370.
41. *De Greve H., Wyns L., Bouckaert J.* Combining sites of bacterial fimbriae // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2007. – **17**. – P. 506–512.
42. *De Jong B., Ekdahl B.* The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries // *BMC Public Health*. – 2006. – **6**. – P. 4.
43. *DeLano W. L.* Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2002. – **12**. – P. 14–20.
44. *Diepold A., Amstutz M., Abel S. et al.* Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome // *EMBO J.* – 2010. – **29**. – P. 1928–1940.
45. *Donda A., Mori L., Shamshiev A., Carena I. et al.* Locally inducible CD66a (CEACAM1) as an amplifier of the human intestinal T cell response // *Eur. J. Immunol.* – 2000. – **30**. – P. 2593–2603.
46. *Du Y., Rosqvist R., Forsberg Å.* Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis // *Infect. Immun.* – 2002. – **70**. – P. 1453–1460.
47. *Dubnovitsky A. P., Duck Z., Kersley J. E. et al.* Conserved hydrophobic clusters on the surface of the Caf1A usher C-terminal domain are important for F1 antigen assembly // *J. Mol. Biol.* – 2010. – **403**. – P. 243–259.
48. *Fahlgren A., Baranov V., Frangmyr L. et al.* Interferon-gamma tempers the expression of carcinoembryonic antigen family molecules in human colon cells: a possible role in innate mucosal defence // *Scand. J. Immunol.* – 2003. – **58**. – P. 628–641.
49. *Felek S., Tsang T. M., Krukonis E. S.* Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence // *Infect. Immun.* – 2010. – **78**. – P. 4134–4150.
50. *Fronzes R., Remaut H., Waksman G.* Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria // *EMBO J.* – 2008. – **27**. – P. 2271–2280.
51. *Fujita T., Inoue T., Ogawa K. et al.* The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF) DAF inhibits the assembly of C3 convertases by dissociating C2a and Bb // *J. Exp. Med.* – 1987. – **166**. – P. 1221–1228.
52. *Galván E. M., Chen H., Schifferli D. M.* The Psa fimbriae of *Yersinia pestis* interact with phosphatidylcholine on alveolar epithelial cells and pulmonary surfactant // *Infect. Immun.* – 2006. – **75**. – P. 1272–1279.
53. *Galyov E. E., Smirnov O. Y., Karlyshev A. V. et al.* Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of the protein // *FEBS Lett.* – 1990. – **277**. – P. 230–232.
54. *Galyov E. E., Karlyshev A. V., Chernovskaya T. V. et al.* Expression of the envelope antigen F1 of *Yersinia pestis* is mediated by the product of *cafIM* gene having homology with the chaperone PapD of *Escherichia coli* // *FEBS Lett.* – 1991. – **286**. – P. 79–82.
55. *Garnett J. A., Martínez-Santos V. I., Saldaca Z. et al.* Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. – **109**. – P. 3950–3955.

56. Garnett J. A., Matthews S. Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2012. – **13**. – P. 739–755.
57. Geibel S., Waksman G. Crystallography and electron microscopy of chaperone/usher pilus systems // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2011. – **715**. – P. 159–174.
58. Giske C. G., Monnet D. L., Cars O., Carmeli Y. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant Gram-negative bacilli // *Antimicrob. Agents Ch.* – 2008. – **52**. – P. 813–821.
59. Grunert F., Kuroki M. CEA family members expressed on hematopoietic cells and their possible role in cell adhesion and signaling. *Cell Adhesion and Communication Mediated by the CEA Family-Basic and Clinical Perspective* (Stanners C. P., ed.). – Harwood Academic Publishers, Amsterdam. – 1998. – P. 99–120.
60. Guignot J., Hudault S., Kansau I. et al. DAF and CEACAMs receptor-mediated internalization and intracellular lifestyle of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* into epithelial cells // *Infect. Immun.* – 2009. – **77**. – P. 517–531.
61. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues // *Semin. Cancer. Biol.* – 1999. – **9**. – P. 67–81.
62. Huang X. Z., Lindler L. E. The pH6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen // *Infect. Immun.* – 2004. – **72**. – P. 7212–7219.
63. Hung D. L., Knight S. D., Woods R. M. et al. Molecular basis of two subfamilies of immunoglobulin-like chaperones // *EMBO J.* – 1996. – **15**. – P. 3792–3805.
64. Imberechts H., Wild P., Charlier G. et al. Characterization of F18 fimbrial genes *fedE* and *fedF* involved in adhesion and length of enterotoxemic *Escherichia coli* strain 107/86 // *Microb. Pathog.* – 1996. – **21**. – P. 183–192.
65. Iriarte M., Cornelis G. R. MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica* // *J. Bacteriol.* – 1995. – **177**. – P. 738–744.
66. Iriarte M., Vanooteghem J. C., Delor I. et al. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica* // *Mol. Microbiol.* – 1993. – **9**. – P. 507–520.
67. Jacob-Dubuisson F., Striker R., Hultgren S. J. Chaperone assisted self-assembly of pili independent of cellular energy // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**. – P. 12447–12455.
68. Jalajakumar M. B., Thomas C. J., Halter R., Manning P. A. Genes for biosynthesis and assembly of CS3 pili of CFA/II enterotoxigenic *Escherichia coli*: novel regulation of pilus production by bypassing an amber codon // *Mol. Microbiol.* – 1989. – **12**. – P. 1685–1695.
69. Jin L. Z., Baidoo S. K., Marquardt R. R., Frohlich A. A. *In vitro* inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to piglet intestinal mucus by egg-yolk antibodies // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1998. – **21**. – P. 313–321.
70. Jouve M., Garcia M. I., Courcoux P. et al. Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the *afa-3* gene cluster are

- mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively // *Infect. Immun.* – 1997. – **56**. – P. 4082–4089.
71. Kammerer R., Hahn S., Singer B. B. et al. Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation // *Eur. J. Immunol.* – 1998. – **28**. – P. 3664–3674.
72. Kammerer R., Stober D., Singer B. B., Obrink B., Reimann J. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation // *J. Immunol.* – 2001. – **166**. – P. 6537–6544.
73. Karlyshev A. V., Galyov E. E., Abramov V. M., Zav'yalov V. P. *cafIR* gene and its role in the regulation of capsule formation of *Y. pestis* // *FEBS Lett.* – 1992a. – **305**. – P. 37–40.
74. Karlyshev A. V., Galyov E. E., Smirnov O. Y. et al. A new gene of the *fI* operon of *Y. pestis* involved in the capsule biogenesis // *FEBS Lett.* – 1992b. – **297**. – P. 77–80.
75. Karlyshev A. V., Galyov E. E., Smirnov O. Y. et al. Structure and regulation of a gene cluster involved in capsule formation of *Y. pestis*. *Biological Membranes: Structure, Biogenesis and Dynamic*, NATO-ASI Series, Vol. H-82 (Op den Kamp JAF, ed), Springer-Verlag, NewYork, NY, 1994. – P. 321–330.
76. Kida Y., Kobayashi M., Takao S. et al. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF- κ B in human gingival fibroblasts // *Cytokine.* – 2005. – **29**. – P. 159–168.
77. Kline K. A., Dodson K. W., Caparon M. G., Hultgren S. J. A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria // *Trends Microbiol.* – 2010. – **18**. – P. 224–232.
78. Knight S. D., Berglund J., Choudhury D. Bacterial adhesins: structural studies reveal chaperone function and pilus biogenesis // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2000. – **4**. – P. 653–660.
79. Knutton S., McConnel M. M., Rowe B., McNeish A. S. Adhesion and ultrastructural properties of human enterotoxigenic *Escherichia coli* producing colonization factor antigens III and IV // *Infect. Immun.* – 1989. – **57**. – P. 3364–3371.
80. Korea C. G., Ghigo J. M., Beloin C. The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: Multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface-colonisation and tissue tropism // *Bioessays.* – 2011. – **33**. – P. 300–311.
81. Korotkova N., Cota E., Lebedin Y. et al. A subfamily of Dr adhesions of *Escherichia coli* bind independently to decay-accelerating factor and the N-domain of carcinoembryonic antigen // *J. Biol. Chem.* – 2006a. – **281**. – P. 29120–29130.
82. Korotkova N., Le Trong I., Samudrala R. et al. Crystal structure and mutational analysis of the DaaE adhesin of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 2006b. – **281**. – P. 22367–22377.

83. Korotkova N., Yang Y., Le Trong I. et al. Binding of Dr adhesins of *Escherichia coli* to carcinoembryonic antigen triggers receptor dissociation // Mol. Microbiol. – 2008a. – **67**. – P. 420–434.
84. Korotkova N., Yarova-Yarovaya Y., Tchesnokova V. et al. *Escherichia coli* DraE adhesin-associated bacterial internalization by epithelial cells is promoted independently by decay-accelerating factor and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule binding and does not require the DraD invasin // Infect. Immun. – 2008b. – **76**. – P. 3869–3880.
85. Kuehn M. J., Heuser J., Normark S., Hultgren S. J. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips // Nature. – 1992. – **356**. – P. 252–255.
86. Lalioui L., Jouve M., Gounon P., Le Bouguédec C. Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves // Infect. Immun. – 1999. – **10**. – P. 5048–5059.
87. Le Bouguédec C., Servin A. L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens // FEMS Microbiol. Lett. – 2006. – **256**. – P. 185–194.
88. Lehti T. A., Bauchart P., Heikkinen J. et al. Mat fimbriae promote biofilm formation by meningitis-associated *Escherichia coli* // Microbiology. – 2010. – **156**. – P. 2408–2417.
89. Lemaitre N., Sebbane F., Long D., Hinnebusch B. J. *Yersinia pestis* YopJ suppresses tumour necrosis factor alpha induction and contributes to apoptosis of immune cells in the lymph node but is not required for virulence in a rat model of bubonic plague // Infect. Immun. – 2006. – **74**. – P. 5126–5131.
90. Levine M. M., Ristaino P., Marley G. et al. Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans // Infect. Immun. – 1984. – **44**. – P. 409–420.
91. Li X. Y., Jin L. J., Uzonna J. E. et al. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): *in vivo* evaluation in a pig model of enteric colibacillosis // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2009. – **129**. – P. 132–136.
92. Li Y-F., Poole S., Rasulova F. et al. A receptor-binding site as revealed by the crystal structure of CfaE, the colonization factor antigen I fimbrial adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. – 2007. – **282**. – P. 23970–23980.
93. Lindberg F., Lund B., Johansson L., Normark S. Localization of the receptor binding protein adhesin at the tip of the bacterial pilus // Nature. – 1987. – **328**. – P. 84–87.
94. Lindler L. E., Tall B. D. *Yersinia pestis* pH6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages // Mol Microbiol. – 1993. – **8**. – P. 311–324.
95. Lindler L. E., Klempner M. S., Straley S. C. *Yersinia pestis* pH6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague // Infect. Immun. – 1990. – **58**. – P. 2569–2577.

96. Liu F., Chen H., Galván E. M. et al. Effects of Psa and F1 on the adhesive and invasive interactions of *Yersinia pestis* with human respiratory tract epithelial cells // *Infect. Immun.* – 2006. – **74**. – P. 5636–5644.
97. Lo A. W., Moonens K., Remaut H. Chemical attenuation of pilus function and assembly in Gram-negative bacteria // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2013. – **16**. – P. 85–92.
98. Louvard D., Kedinger M., Hauri H. P. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures // *Annu. Rev. Cell Biol.* – 1992. – **8**. – P. 157–195.
99. Lublin D. M., Atkinson J. P. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function // *Annu Rev Immunol.* – 1989. – **7**. – P. 35–58.
100. MacIntyre S., Zyrianova I. M., Chernovskaya T. V. et al. An extended hydrophobic interactive surface of *Yersinia pestis* Caf1M chaperone is essential for subunit binding and F1 capsule assembly // *Mol. Microbiol.* – 2001. – **39**. – P. 12–25.
101. Makoveichuk E., Cherepanov P., Lundberg S. et al. pH6 antigen of *Yersinia pestis* interacts with plasma lipoproteins and cell membranes // *Lipid Res.* – 2003. – **44**. – P. 320–330.
102. Marketon M. M., Depaolo R. W., Debord K. L. et al. Plague bacteria target immune cells during infection // *Science.* – 2005. – **309**. – P. 1739–1741.
103. Martínez-Santos V. I., Medrano-Lypez A., Saldaca Z. et al. Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2012. – **194**. – P. 5020–5033.
104. Moonens K., Bouckaert J., Coddens A. et al. Structural insight in histoblood group binding by the F18 fimbrial adhesin FedF // *Mol. Microbiol.* – 2012. – **86**. – P. 82–95.
105. Nakajima A., Iijima H., Neurath M. F. et al. Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function // *J. Immunol.* – 2002. – **168**. – P. 1028–1035.
106. Nishiyama M., Vetsch M., Puorger C. et al. Identification and characterization of the chaperone subunit complex-binding domain from the Type 1 pilus assembly platform FimD // *J. Mol. Biol.* – 2003. – **330**. – P. 513–525.
107. Nishiyama M., Horst R., Eidam O. T. et al. Structural basis of chaperone–subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD // *EMBO J.* – 2005. – **24**. – P. 1–12.
108. Nouvion A. L., Beauchemin N. CEACAM1 as a central modulator of metabolism, tumor progression, angiogenesis and immunity // *Med. Sci. (Paris)*. – 2009. – **25**. – P. 247–252.
109. Nowicki B., Moulds J., Hull R., Hull S. A hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli* recognizes the Dr blood group antigen // *Infect. Immun.* – 1988. – **56**. – P. 1057–1060.
110. Nuccio S-P., Bäumlér A. J. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes greek // *Microbiol. Mol. Biol. R.* – 2007. – **71**. – P. 551–575.
111. Öbrink B. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1997. – **9**. – P. 616–626.

112. Oleksiewicz M. B., Nagy G., Nagy E. Anti-bacterial monoclonal antibodies: Back to the future? // Arch. Biochem. Biophys. – 2012. – **526**. – P. 124–131.
113. Pauly D., Dorner M., Zhang X. et al. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period // Poult Sci. – 2009. – **8**. – P. 281–290.
114. Payne D., Tatham D., Williamson E. D., Titball R. W. pH6 antigen of *Yersinia pestis* binds to β 1-linked galactosyl residues in glycosphingolipids // Infect Immun. – 1998. – **66**. – P. 4545–4548.
115. Perry R. D., Fetherston J. D. *Yersinia pestis* - etiologic agent of plague // Clin. Microbiol. Rev. – 1997. – **10**. – P. 35–66.
116. Pettigrew D., Anderson K. L., Billington J. et al. High resolution studies of the Afa/Dr adhesin DraE and its interaction with chloramphenicol // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**. – P. 46851–46857.
117. Pham T. Q., Goluszko P., Popov V. et al. Molecular cloning and characterization of Dr-II A nonfimbrial adhesin-I-like adhesin isolated from gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* that binds to decayaccelerating factor // Infect. Immun. – 1997. – **10**. – P. 4309–4318.
118. Picard B., Garcia J. S., Gouriou S. et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection // Infect Immun. – 1999. – **67**. – P. 546–553.
119. Pouttu R., Westerlund-Wikstrom B., Lang H. et al. Matb, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group // J. Bacteriol. – 2001. – **183**. – P. 4727–4736.
120. Pujol C., Klein K. A., Romanov G. A. et al. *Yersinia pestis* can reside in autophagosomes and avoid xenophagy in murine macrophages by preventing vacuole acidification // Infect. Immun. – 2009. – **77**. – P. 2251–2261.
121. Rasko D. A., Webster D. R., Sahl J. W. et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic–uremic syndrome in Germany // N. Engl. J. Med. – 2011. – **365**. – P. 709–717.
122. Remaut H., Rose R. J., Hannan T. J. et al. Donor-strand exchange in chaperone-assisted pilus assembly proceeds through a concerted β strand displacement mechanism // Mol. Cell. – 2006. – **22**. – P. 831–842.
123. Rendon M. A., Saldana Z., Erdem A. L. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – **104**. – P. 10637–10642.
124. Rey-Campos J., Rubinstein P., de Cordoba S. R. A physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP // J. Exp. Med. – 1988. – **167**. – P. 664–669.
125. Rougeaux C., Berger C. N., Servin A. L. CEACAM1-4L down-regulates hDAF-associated signaling after being recognized by the Dr adhesin of diffusely adhering *Escherichia coli* // Cell Microbiol. – 2008. – **10**. – P. 632–654.
126. Roy S. P., Rahman M. M., Yu X. D. et al. Crystal structure of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor CS6 reveals a novel type of functional assembly // Mol. Microbiol. – 2012. – **86**. – P. 1100–1115.

127. Runco L. M., Myrczek S., Bliska J. B., Thanassi D. G. Biogenesis of the fraction 1 capsule and analysis of the ultrastructure of *Yersinia pestis* // J. Bacteriol. – 2008. – **190**. – P. 3381–3385.
128. Saldana Z., Erdem A. L., Schuller S. et al. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli* // J. Bacteriol. – 2009. – **191**. – P. 3451–3461.
129. Salih O., Remaut H., Waksman G., Orlova E. V. Structural analysis of the Saf pilus by electron microscopy and image processing // J. Mol. Biol. – 2008. – **379**. – P. 174–187.
130. Sauer F. G., Futterer K., Pinkner J. S. et al. Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis // Science. – 1999. – **285**. – P. 1058–1061.
131. Sauer F. G., Barnhart M., Choudhury D. et al. Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment // Curr. Opin. Struc. Biol. – 2000. – **10**. – P. 548–556.
132. Sauer F. G., Pinkner J. S., Waksman G., Hultgren S. J. Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation // Cell. – 2002. – **111**. – P. 543–551.
133. Sauer F. G., Remaut H., Hultgren S. J., Waksman G. Fiber assembly by the chaperone–usher pathway // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – **1694**. – P. 259–267.
134. Scaletsky I. C. A., Michalski J., Torres A. G. et al. Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesion found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* // Infect. Immun. – 2005. – **73**. – P. 4753–4765.
135. Selvarangan R., Goluszko P., Singhal J. et al. Interaction of Dr adhesin with collagen Type IV is a critical step in *Escherichia coli* renal persistence // Infect. Immun. – 2004. – **72**. – P. 4827–4835.
136. Servin A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* // Clin. Microbiol. Rev. – 2005. – **18**. – P. 264–292.
137. Soliakov A., Harris J. R., Watkinson A., Lakey J. H. The structure of *Yersinia pestis* Caf1 polymer in free and adjuvant bound states // Vaccine. – 2010. – **28**. – P. 5746–5754.
138. Sebbane F., Lemaitre N., Sturdevant D. E. et al. Adaptive response of *Yersinia pestis* to extracellular effectors of innate immunity during bubonic plague // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**. – P. 11766–11771.
139. Sebbane F., Jarrett C., Gardner D. et al. The *Yersinia pestis* cafIM1A1 fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague // Infect. Immun. – 2009. – **77**. – P. 1222–1229.
140. Schade R., Pfister C., Halatsch R., Henklein P. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg—an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits // ATLA. – 1991. – **19**. – P. 403–419.
141. Schade R., Zhang X-Y., Terzolo H. R. Use of IgY antibodies in human and veterinary medicine. In Bioactive Egg Compounds, ed. Huopalahti R., Lypez-Fandino R., Anton M. & Schade R. – New York: Springer, 2007. – P. 213–222.

142. Sharma R. K., Sodhi A., Batra H. V. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in rF1 mediated activation of murine peritoneal macrophages *in vitro* // J. Clin. Immunol. – 2005a. – **3**. – P. 215–223.
143. Sharma R. K., Sodhi A., Batra H. V., Tuteja U. Phosphorylation of p42/44 MAP kinase is required for rF1-induced activation of murine peritoneal macrophages // Mol. Immunol. – 2005b. – **42**. – P. 1385–1392.
144. Smeds A., Hemmann K., Jakava-Viljanen M. *et al.* Characterization of the adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae // Infect. Immun. – 2001. – **69**. – P. 7941–7945.
145. Smiley S. T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague // Expert. Rev. Vaccines. – 2008a. – **7**. – P. 209–221.
146. Smiley S. T. Immune defense against pneumonic plague // Immunol. Rev. – 2008b. – **225**. – P. 256–271.
147. Sodhi A., Sharma R. K., Batra H. V., Tuteja U. Recombinant fraction 1 protein of *Yersinia pestis* activates murine peritoneal macrophages *in vitro* // Cell. Immunol. – 2004. – **229**. – P. 52–61.
148. Soto G. E., Hultgren S. J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly // J. Bacteriol. – 1999. – **181**. – P. 1059–1071.
149. Thanassi D. G., Saulino E. T., Hultgren S. J. The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway // Curr. Opin. Microbiol. – 1998. – **1**. – P. 223–231.
150. Thompson J. A., Grunert F., Zimmerman W. Carcinoembryonic antigen family: molecular biology and clinical perspective // J. Clin. Lab. Anal. – 1991. – **5**. – P. 344–366.
151. Tini M., Jewell U. R., Camenisch G. *et al.* Generation and application of chicken egg-yolk antibodies // Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. – 2002. – **131**. – P. 569–574.
152. van den Broeck W., Cox E., Oudega C., Goddeeris B. M. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors // Vet Microbiol. – 2000. – **71**. – P. 223–244.
153. Van Molle I., Joensuu J., Buts L. *et al.* Chloroplasts assemble the major subunit FaeG of *Escherichia coli* F4 (K88) fimbriae to strand-swapped dimers // J. Mol. Biol. – 2007. – **368**. – P. 791–799.
154. Van Molle I., Moonens K., Garcia-Pino A. *et al.* Structural and thermodynamic characterization of pre- and postpolymerization states in the F4 fimbrial subunit FaeG // J. Mol. Biol. – 2009. – **394**. – P. 957–967.
155. Velan B., Bar-Haim E., Zauberman A. *et al.* Discordance in the effects of *Yersinia pestis* on dendritic cell functions: induction of maturation and paralysis of migration // Infect. Immun. – 2006. – **74**. – P. 6365–6376.
156. Verger D., Bullitt E., Hultgren S. J., Waksman G. Crystal structure of the P pilus rod subunit PapA // PLoS Pathogens. – 2007. – **3**. – P. e73.
157. Viboud G. I., Bliska J. B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis // Annu. Rev. Microbiol. – 2005. – **59**. – P. 69–89.
158. Weening E. H., Cathelyn J. S., Kaufman G. *et al.* The dependence of the *Yersinia pestis* capsule on pathogenesis is influenced by the mouse background // Infect. Immun. – 2011. – **79**. – P. 644–652.

159. Welkos S. L., Andrews G. P., Lindler L. E. et al. Mu dII(Ap lac) mutagenesis of *Yersinia pestis* plasmid pFra and identification of temperature-regulated loci associated with virulence // Plasmid. – 2004. – **51**. – P. 1–11.
160. Westerlund B., Korhonen T. K. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix // Mol. Microbiol. – 1993. – **9**. – P. 687–694.
161. Westerlund B., Kuusela P., Risteli J. et al. The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein // Mol. Microbiol. – 1989. – **3**. – P. 329–337.
162. Westerlund-Wikström B., Korhonen T. K. Molecular structure of adhesin domains in *Escherichia coli* fimbriae // Int. J. Med. Microbiol. – 2005. – **295**. – P. 479–486.
163. Williamson E. D. Plague // Vaccine. – 2009. – **27**. – P. D56–60.
164. Wolf M. K., De Haan L. A. M., Cassels F. J. et al. The CS6 colonization factor of human enterotoxigenic *Escherichia coli* contains two heterologous major subunits // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – **148**. – P. 35–42.
165. Yang Y., Isberg R. R. Transcriptional regulation of the *Yersinia pseudotuberculosis* pH6 antigen adhesin by two envelope-associated components // Mol. Microbiol. – 1997. – **24**. – P. 499–510.
166. Yokoyama H., Peralta R. C., Diaz R. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets // Infect. Immun. – 1992. – **60**. – P. 998–1007.
167. Yu X., Visweswaran G. R., Duck Z. et al. Caf1A usher possesses a Caf1 subunit-like domain that is crucial for Caf1 fibre secretion // Biochem. J. – 2009. – **418**. – P. 541–551.
168. Yu X. D., Dubnovitsky A., Pudney A. F. et al. Allosteric mechanism controls traffic in the chaperone/usher pathway // Structure. – 2012a. – **20**. – P. 1861–1871.
169. Yu X. D., Fooks L. J., Moslehi-Mohebi E. et al. Large is fast, small is tight: determinants of speed and affinity in subunit capture by a periplasmic chaperone // J. Mol. Biol. – 2012b. – **417**. – P. 294–308.
170. Zalewska B., Piątek R., Bury K. et al. A surface-exposed DraD protein of uropathogenic *Escherichia coli* bearing Dr fimbriae may be expressed and secreted independently from DraC usher and DraE adhesion // Microbiology. – 2005. – **151**. – P. 2477–2486.
171. Zalewska-Piątek B., Bury K., Piątek R. et al. Type II secretory pathway for surface secretion of DraD invasion from the uropathogenic *Escherichia coli* Dr1 strain // J. Bacteriol. – 2008. – **190**. – P. 5044–5056.
172. Zavialov A., Zav'yalova G., Korpela T., Zav'yalov V. FGL chaperone-assembled fimbrial polyadhesins: anti-immune armament of Gram-negative bacterial pathogens // FEMS Microbiol. Rev. – 2007. – **31**. – P. 478–514.
173. Zavialov A. V., Knight S. D. A novel self-capping mechanism controls aggregation of periplasmic chaperone Caf1 // Mol. Microbiol. – 2007. – **64**. – P. 153–164.
174. Zavialov A. V., Batchikova N. V., Korpela T. et al. Secretion of recombinant proteins via the chaperone/usher pathway in *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microb. – 2001. – **67**. – P. 1805–1814.

175. Zavialov A. V., Kersley J., Korpela T. et al. Donor strand complementation mechanism in the biogenesis of non-pilus systems // *Mol. Microbiol.* – 2002. – **45**. – P. 983–995.
176. Zavialov A. V., Berglund J., Pudney A. F. et al. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation // *Cell*. – 2003. – **113**. – P. 587–596.
177. Zavialov A. V., Tischenko V. M., Fooks L. J. et al. Resolving the energy paradox of chaperone-mediated fibre assembly // *Biochem. J.* – 2005. – **389**. – P. 685–694.
178. Zav'yalov V. Fimbrial polyadhesins: anti-immune armament of *Yersinia* // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – **954**. – P. 183–201.
179. Zav'yalov V. P., Chernovskaya T. V., Navolotskaya E. V. et al. Specific high affinity binding of human interleukin 1 β by Caf1A usher protein of *Yersinia pestis* // *FEBS Lett.* – 1995a. – **371**. – P. 65–68.
180. Zav'yalov V. P., Zav'yalova G. A., Denesyuk A. I., Korpela T. Modelling of steric structure of a periplasmic molecular chaperone Caf1M of *Yersinia pestis*, a prototype member of a subfamily with characteristic structural and functional features // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1995b. – **11**. – P. 19–24.
181. Zav'yalov V. P., Abramov V. M., Cherepanov P. G. et al. pH6 antigen (PsaA protein) of *Yersinia pestis*, a novel bacterial Fc-receptor // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1996. – **14**. – P. 53–57.
182. Zav'yalov V. P., Chernovskaya T. V., Chapman D. A. G. et al. Influence of the conserved disulphide bond exposed to the putative binding pocket, on the structure and function of the immunoglobulin-like periplasmic molecular chaperone, Caf1M, of *Yersinia pestis* // *Biochem. J.* – 1997. – **324**. – P. 571–578.
183. Zav'yalov V., Zavialov A., Zav'yalova G., Korpela T. Adhesive organelles of Gram negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint // *FEMS Microb. Rev.* – 2010. – **34**. – P. 317–378.
184. Zhang W., Sack D. A. Progress and hurdles in the development of vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans // *Expert. Rev. Vaccines*. – 2012. – **11**. – P. 677–694.
185. Zhou H., Monack D. M., Kayagaki N. et al. *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF- κ B activation // *J. Exp. Med.* – 2005. – **202**. – P. 1327–1332.

SENSING AND SIGNALING FOR PEROXISOME AUTOPHAGIC DEGRADATION (PEXOPHAGY) IN YEASTS

Andriy A. SIBIRNY^{1,2}

¹Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;

²University of Rzeszow, Zelwerowicza 4, Rzeszow 35-601 Poland

*Yeast cells, similarly to cells of other eukaryotic organisms, possess intracellular organelles, including that of peroxisomes also known as microbodies. Enzymes of oxidative metabolism, mainly hydrogen peroxide generating oxidases, catalase, some enzymes of glyoxylic cycle and enzymes involved in catabolism of unusual carbon sources (n-alkanes, methanol) are located in peroxisomes. Especially important role plays peroxisomes in methylotrophic yeasts, unique eukaryotic organisms capable to utilize one-carbon compound, methanol. During on methanol, active proliferation and biogenesis of peroxisomes occur, so these organelles can occupy between 30 and 80% of cellular volume. After shift of methanol-grown cells into media with multicarbon substrates, such as glucose or ethanol, excess of peroxisomes degrades in the specific process known as autophagic degradation of peroxisomes or pexophagy. There are known 36 AuTophagy related genes, known as ATG genes, which products are involved also in pexophagy. At the same time, not much is known on mechanisms of glucose and ethanol sensing and signaling which initiate pexophagy process. Proteins Pfk1(α -subunit of phosphofructokinase), Slt2 (mitogen-activating protein kinase) Gpr1 and Gpa2 (components of GPCR system) and Snf3 and Ggt2 (high- and low-affinity glucose sensors) was found to be involved in signaling of glucose-induced pexophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. In the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, glucose sensing protein Gss1 was found to be important for glucose-induced pexophagy. Very few is known on mechanisms of ethanol sensing and signaling during pexophagy which is an important problem for future studies.*

Methylotrophic yeasts are unique eukaryotic organisms capable of utilizing one-carbon toxic substrate, methanol. During methylotrophic growth, peroxisomes occupy 30-80% of cellular volume. Shift of methylotrophically-grown cells to media with alternative carbon sources, glucose or ethanol, induces massive peroxisome degradation. In *Pichia pastoris*, two morphologically distinct events have been observed, macro- and microautophagy; in other species, mostly macroautophagy was noted under massive peroxisome degradation. It was found that genes involved in non-specific autophagy (most of them are known as ATG genes) also participate in carbon-induced pexophagy. Many ATG genes have been

discovered on the models of methylotrophic yeasts, mainly *P. pastoris*, due to convenient and easy methods for pexophagy monitoring. However, mechanisms of glucose and ethanol sensing and signaling which initiate subsequent events of micro- and macroautophagy are poorly understood. Also the nature of the low-molecular-weight effectors, derivatives of glucose and ethanol, which induce pexophagy, has not been identified.

It was found that *P. pastoris* possesses a single glucose sensor Gss1, ortholog of *S. cerevisiae* high- and low-affinity glucose sensors Snf3 and Rgt2, respectively. Gss1 protein participates in glucose sensing involved in pexophagy and glucose catabolite repression. In contrast to *Saccharomyces cerevisiae*, *P. pastoris* orthologs of GPCR signaling proteins Gpr1 and Gpa2 do not participate in glucose signaling of pexophagy. It is known that one of the signal proteins participating in micropexophagy in *P. pastoris* is α -subunit of phosphofructokinase Pfk1, whose catalytic activity is not necessary for glucose induced micropexophagy. The role of Slt2, mitogen-activated protein kinase (MAPK), was also revealed in glucose signaling of pexophagy. Ethanol signaling was studied in mutants defective in ethanol catabolism of the yeast *P. methanolica*. It was suggested that in the medium with ethanol, glyoxylic acid is the substance which triggers pexophagy.

1. Peroxisomes and their functions

Peroxisomes are ubiquitous organelles present in virtually all eukaryotic cells, with exception of Archaezoa (Michels et al., 2005; Brown and Baker, 2008). Peroxisomes also known as microbodies (specific types of these organelles are also named as glyoxysomes and glycosomes) are organelles surrounded by a single membrane, their size is of 0.5–1.5 μm at an average. They do not contain DNA, RNA and ribosomes. Cell can contain from 1-2 peroxisomes (e.g. yeast growing on glucose) to several hundred peroxisomes as mammalian cells (Till et al., 2012). According to the name, peroxisomes harbor H_2O_2 -producing oxidases and decomposing latter compound catalase. However, peroxisomes are extremely versatile organelles sometimes specializing in different functions. An interesting peculiarity of peroxisomal catabolizing enzymes is their inability to produce ATP, which distinguishes them from catabolic enzymes located in mitochondria (Mast et al., 2010). Liver peroxisomes contain enzymes that enable to metabolize both very-long-chain fatty acids and β -oxidation of fatty acids and bile acid precursors with the oxidation of ingested ethanol to acetaldehyde to account for as much as 50% of the total metabolism of ethanol when substrates for the branched-chain fatty acids, phytanic acid and lipid-based xenobiotics. In yeasts, peroxisomes are responsible for initial steps of methanol and fatty acid catabolism (Veenhuis et al., 1983; van der Klei et al., 2006). In addition to catabolic, peroxisomes fulfill biosyn-

thetic functions. In mammals, peroxisomes harbor enzymes participating in synthesis of bile acids, cholesterol and plasmalogens (Wanders et al., 2010). In mycelial fungi, peroxisomes are involved in lysine biosynthesis in yeasts and penicillin biosynthesis in mycelial fungi (Schrader and Fahimi, 2008; Aksam et al., 2009; Meijer et al., 2010). In parasitic protozoa of the genera *Trypanosoma* and *Leishmania*, glycolytic enzymes occur in a specialized peroxisome, which is known as glycosome (Michels et al., 2006). The compartmentalization of glycolytic enzymes is essential for the survival of these protozoa. Voronin bodies, which serve to plug septal pores in mycelial fungi, are also specialized peroxisomes. Plant peroxisomes are classified into three groups: glyoxisomes, leaf peroxisomes, and unspecialized peroxisomes. There are approximately 50 proteins in animal and fungal peroxisomes and approximately 100 proteins in plant peroxisomes. Proteomic and genetic studies continuously reveal new functions for peroxisomes (Michels et al. 2005; Lanyon-Hogg et al., 2010).

Defects in peroxisome structure and functions underlie many human diseases. The so called Zellweger syndrome is the best known peroxisomal inheritable disease. Patients with Zellweger syndrome fall into four groups with different defects in protein transport to peroxisomes. The defects occur in peroxisomal protein transport, which involves only peroxisome targeting signal 1 (PTS1), only PTS2, both PTS1 and PTS2, or the two (PTS1 and PTS2) protein translocation pathways and peroxisomal membrane biogenesis (Subramani, 1997). Peroxisome damage has serious consequences and is often fatal, causing death within the first year of life (Steinberg et al., 2006). It is of interest that identical genetic defects were observed in yeasts with distorted peroxisome biogenesis (so called *pex* mutants) (Subramani, 1998). In summary, peroxisomes are surprisingly dynamic organelles, whose dimensions, number in the cell, and protein content change in response to environmental changes. Peroxisome biogenesis is accompanied by other processes, including signal transduction (Saleem et al., 2008), chromatin modification (Wan et al., 2011), reorganization of transcription networks (Smith et al., 2002), and changes in the peroxisomal proteome (Marelli et al., 2004; Saleem et al., 2006).

Yeasts provide a convenient model to study the mechanisms of peroxisome biogenesis because cell transfer from a glucose-containing medium into a medium with oleate and/or methanol in the case of methylotrophic yeasts induces synthesis of peroxisomal enzymes and the growth and division of peroxisomes. Peroxisomes may occupy up to 80% of the cell volume in cells growing in the presence of methanol under certain conditions (Veennuis et al., 2003; Sibirny, 2012). When cells growing in the presence of methanol or oleate are transferred into a glucose-containing medium or from methanol- to ethanol-containing medium, the transfer is rapidly

followed by autophagic degradation of the majority of peroxisomes (pexophagy), while one peroxisome somehow avoids this degradation in a way that is still unclear (Dunn et al., 2005). Methylophilic yeasts appear to be one of the most convenient models for studying peroxisome biogenesis and degradation due to ability of methanol to induce massive propagation of peroxisomes. As a result, one or two small peroxisomes present in cells during growth in glucose are substituted by numerous large peroxisomes which occupy near 30% of cell volume during batch cultivation and up to 80% of cell volume under continuous cultivation under low dilution rate in methanol as sole carbon and energy source (Veenhuis et al., 2003). Inverse shift of methanol-grown cells to glucose (or ethanol) causes major reorganization of intracellular structure leading to degradation of the majority of peroxisomes due to autophagic process; consequently, from 30 to 80% of cell volume is degraded. Methods of classical and molecular genetics are well developed for several species of methylophilic yeasts (Cregg et al., 2008; Faber et al., 1995; Lahtchev et al., 2002; Tolstorukov et al., 2007) and genome sequence of several type strains are publicly available (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_organism?org=ppa or <http://www.pichiagenome.org/> for *P. pastoris* and <http://genomeportal.jgi-psf.org/Hanpo2/Hanpo2.info.html> for *H. polymorpha*). Thus, available tools permits mechanistic description of events which occur during autophagic degradation of peroxisomes in methylophilic yeasts.

2. General characteristics of pexophagy

Pexophagy is the special type of autophagy, namely, autophagic vacuolar (lysosomal) degradation of peroxisomes. Autophagy could be involved in degradation of cytosolic components and some of cellular organelles (e.g. mitochondria, nucleus, endoplasmic reticulum) and macromolecular complexes (e.g. ribosomes). These specific types of autophagy have own names, such as mitophagy, piecemeal microautophagy of the nucleus (PMN), ER-phagy, ribophagy (Kiel, 2010; Sibirny, 2011).

Autophagy of cytosolic cell components mostly occurs due to non-specific process though specific autophagy is proved to be responsible for degradation of fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase in the baker's yeast *S. cerevisiae*. The shift of methylophilic yeasts from methanol to glucose medium leads, in addition to autophagy degradation of peroxisome (pexophagy), to inactivation of cytosolic enzymes of methanol metabolism (formaldehyde dehydrogenase, formate dehydrogenase, fructose-1,6-bisphosphatase) and FAD synthesis (riboflavin kinase, FAD synthetase) (Brooke et al., 1986). Inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in *P. pastoris* apparently occurs due to degradation process

(O. Dmytruk, A. Sibirny, unpublished). However, it is not known till now where the mentioned enzyme inactivation is a result of autophagic process.

Pexophagy can occur as part of non-specific general autophagy mechanism. Apparently it takes place during yeast propagation in each medium as a component of cell constituent maintenance, housekeeping or turnover mechanism (Aksam et al., 2007). However, massive pexophagy occurs during the shift from some cultivation conditions to other ones. The last type of pexophagy is the specific one. Peroxisome degradation in *H. polymorpha*, similarly to mammal cells, could also occur in the process which is unrelated to autophagy, but involves permeabilization of the peroxisomal membrane mediated by 15-lipoxygenase (Baerends et al., 1996; Yokota, 2003). Upon lysis, the contents of the peroxisome become digested by cytosolic proteases. In *H. polymorpha*, such kind of peroxisome disintegration was observed in a constructed strain where the levels of the peroxin Pex3 had been strongly reduced. This suggests that loss of certain peroxisomal membrane proteins may destabilize the peroxisomal membrane, resulting in its lysis. Genes involved in pexophagy in methylotrophic yeasts are homologous to those found in *S. cerevisiae* (van Zutphen et al., 2008; Polupanov et al., 2011; Till et al., 2012; Suzuki, 2013).

The methods for isolation of the mutants defective in pexophagy have been developed in methylotrophic yeasts. All of them belong to negative selection methods when a few mutant colonies grow on plates among a huge number of wild type colonies, and mutants are identified afterwards directly in colonies using peroxisome enzyme analysis (Stasyk et al., 2008a). Apart from mutagenesis under standard mutagen treatment, the insertion mutagenesis using DNA fragments was proposed, which substantially facilitates further cloning of mutant genes (Mukaiyama et al., 2002).

Most of steps and genes involved in specific pexophagy also participate in general (non-specific) autophagy. The steps of autophagy and participating genes are as follows (Manjithaya et al., 2010) (Fig. 1).

1. Signaling proteins required for autophagy induction: protein kinase Tor1, protein kinase A, Sch9, Tap42, and phosphatase type 2A.
2. Packaging of protein or organelle transported for degradation (Atg19, Atg11, and Atg8).
3. Formation of preautophagosomal structure (Atg1, Atg11, Atg13, Atg17, Atg29, and Atg31).
4. Vesicle nucleation (Atg6, Atg9, and phosphatidylinositol 3-kinase).
5. Vesicle expansion and completion (Atg3-5, Atg6, Atg7, Atg8, Atg10, Atg12, Atg14, and Atg16).
6. Protein retrieval (Atg1, Atg2, Atg18, Atg23, and Atg27).
7. Homotypical fusion of isolation membrane (Tlg2).

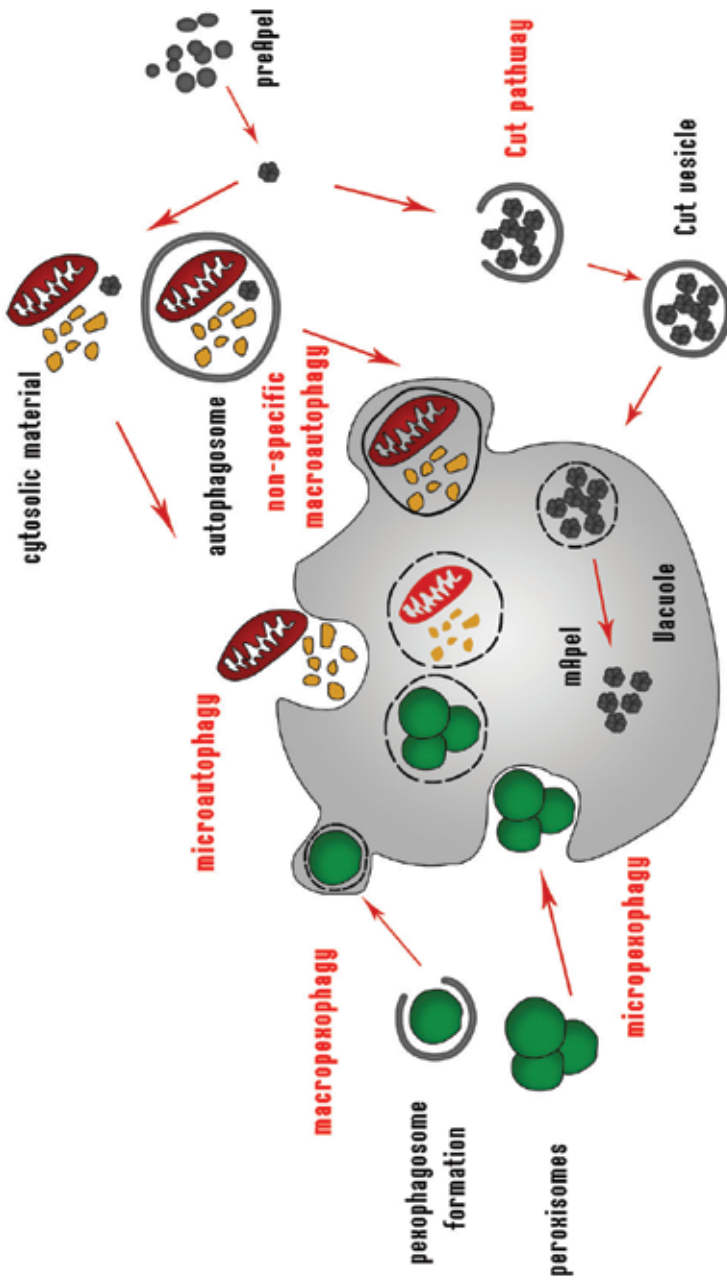


Fig. 1. Scheme of main autophagic processes

8. Transport and heterotypical fusion of autophagosome and vacuoles (v- and t-SNAREs, Ccz1, Mon1, and HOPS complex).

9. Intravacuolar vesicle degradation (Atg15, proteinase A, and proteinase B).

From 36 Atg proteins currently known, only 17 are necessary for all types of autophagy (selective and nonselective), whereas the other 19 are specific: either used in special pathways of selective autophagy or representing species specific modifications.

Specific pexophagy pathways utilize several specific proteins which do not participate in non-specific autophagy. During pexophagy, the specific PAS is formed, distinct from PAS structures which are produced during other types of selective autophagy. The pexophagy-specific PAS is organized by Atg11, Atg17, and Atg30 (Farre et al., 2008; Nazarko et al., 2009).

Studying pexophagy in the methylotrophic yeast *P. pastoris* revealed two morphologically diverse pexophagy processes, called macropexophagy and micropexophagy (Manjithaya et al., 2010; Farre and Subramani, 2004; Tuttle and Dunn, 1995; Sakai et al., 1998; Sibirny, 2011). During macropexophagy initiated by transferring cells from methanol medium to ethanol medium, individual peroxisomes are gathered in double membrane structures called pexophagosomes that merge with vacuoles leading to degradation and repeated usage of pexophagosomal contents. During micropexophagy (occurring after transferring methylotrophically grown cells to glucose medium) peroxisome clusters are engulfed by vacuolar sequestering membranes (VSM) and specific micropexophagy apparatus (MIPA) (Mukaiyama et al., 2004), which forms a cap above a cup-shaped vacuolar sequestering membrane surrounding a peroxisome (Farre et al., 2009). Heterotypical fusion between vacuolar sequestering membranes and the specific micropexophagy apparatus transports peroxisomes inside the vacuole for degradation and repeated use of its components. The specific micropexophagy apparatus and pexophagosomes originate from the preautophagosomal structure PAS. Glucose and ethanol were shown to be specific inducers of micro- and macropexophagy, correspondingly.

There are several specific proteins involved only in pexophagy and not in the other types of autophagy: Atg24, Atg26, Atg28 and Atg30. *P. pastoris* Atg24 localizes to the pexophagosome-vacuole fusion complex during macropexophagy. This protein contains PtdIns3P-binding module (Ano et al., 2005a). Defect of PpAtg24 blocked pexophagy after pexophagosome formation and before its fusion to the vacuole. Apparently PpAtg24 is involved in pexophagosome fusion with the vacuole. Micropexophagy is also impaired in $\Delta atg24$ cells. *ATG26* encodes for enzyme, sterol glucoside transferase (Oku et al., 2003; Stasyk et al., 2003) which is involved in pexophagy in *P. pastoris* but not in alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipo-*

lytica. It was found that in *P. pastoris*, Atg26 is the only one necessary for pexophagy of large peroxisomes, accumulated in methanol medium. Pexophagy of small peroxisomes in this species, induced by oleate or methylamine, only partially depends on Atg26 and its product, sterol glucoside (Nazarko et al., 2007 a,b). It was also shown that *P. pastoris* Atg26 is required for elongation of the pre-autophagosomal structure (PAS) into the MIPA during micropexophagy (Yamashita et al., 2006). It was hypothesized that in *P. pastoris*, sterol glucosides acquired a new function during evolution related to facilitation of the elongation of the double membranes from the PAS. The enhancer function of sterol glucosides becomes essential when cells are challenged with elongation of the extremely large double membranes, i.e., during biogenesis of the MIPA or pexophagosome, around methanol-induced peroxisomes (Nazarko et al., 2007b).

P. pastoris ATG28 also encodes pexophagy specific protein as its deficiency impairs both pexophagic mechanisms (macro- and micropexophagy) and only partially affects the general (non-specific bulk turnover) autophagy induced by nitrogen starvation (Stasyk et al. 2006b; Nazarko et al., 2009). Atg28 contains a coiled-coil domain that overlaps with a putative leucine zipper motif. This coiled-coil region in Atg28 may be involved in oligomerization and protein-protein interactions. It is functionally important, as modified Atg28 lacking coiled-coil is not functionally active. Atg28 is involved in the formation of one or more protein complexes specific for pexophagy and its interaction with micropexophagy-specific protein Atg35 was experimentally proved (Nazarko et al. 2011, see below). Atg28 exhibits a complex intracellular localization pattern. In most methanol-induced cells, this protein was localized to the cytosol. However, in some cells, the fusion protein was also localized to punctate structures of unknown nature associated with vacuoles and to the vacuolar membrane. In rare cases, Atg28 could be seen localized to the vacuolar matrix.

Another pexophagy-specific protein is Atg30. Two other proteins specifically involved in pexophagy and not in general autophagy or other types of specific autophagy are Pex3 and Pex14, known as peroxins also involved in peroxisome biogenesis. In *P. pastoris*, Atg30 interacts with two proteins, Pex3 and Pex14, localized on the peroxisomal membrane (Farre et al., 2008). Effective peroxisome homeostasis probably requires their biogenesis and degradation to be coordinated. It was shown that interacting partners of Atg30 are proteins participating in peroxisome biogenesis. Thus, Pex3 is important for peroxisome biogenesis, and Pex14 – for protein import to peroxisomal matrix (Ma and Subramani 2009). In *H. polymorpha* Pex14, more exactly the 64 N-terminal amino acid residues, are necessary for pexophagy (Bellu et al., 2001a; van Zutphen et al., 2008). Also, it was shown that during macropexophagy in *H. polymorpha* Pex3 is removed

from peroxisomes and does not undergo degradation (Bellu et al., 2002). The way Pex3 is removed from peroxisomes is unknown. Pex3 is known to be required for stabilization of a complex of proteins with a RING finger domain (Really Interesting New Gene, structural domain similar to protein zinc finger) of peroxisome importer (Hazra et al., 2002). Therefore, at this stage, besides inhibiting peroxisome biogenesis, also destabilization of some complexes in peroxisomal membrane occurs.

In *P. pastoris*, a gene designated *PDG1* (Peroxisome DeGradation) was identified whose mutations led to disturbances in peroxisome degradation (Dunn et al., 2005; O. Stasyk and A. Sibirny, unpublished data). Moreover, such mutations disturbed localization of peroxisomal proteins that, apart from peroxisomes, were also localized in cytosol, indicating disturbance in peroxisome biogenesis in *pdg1* mutants. Corresponding protein Pdg1 is a membrane peroxin, which confirms its role in peroxisome biogenesis.

In *H. polymorpha*, the transcriptional repressor Tup1 was shown to be essential for macropexophagy (Leao-Helder et al., 2004). Defects in orthologs of presumable corepressors involved in glucose catabolite repression, *MIG1* and *MIG2*, also showed impairment in pexophagy (Stasyk et al., 2007). As mutants defective in *MIG1* and *MIG2* were not affected in glucose catabolite repression, one may assume that functions of these genes are different between baker's and methylotrophic yeasts.

3. Micro- and macropexophagy in *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha*

As was pointed above, macropexophagy could be observed in *P. pastoris* after shift of methanol-grown cells to the medium with ethanol whereas micropexophagy is observed when methanol-grown cells are transferred into medium with glucose (Tuttle and Dunn, 1995). Other methylotrophic yeast, *H. polymorpha*, is characterized by macropexophagy independently on carbon source which induces pexophagy (van Zutphen et al., 2008). During macropexophagy, multiple membrane layers sequester a single peroxisome resulting in the formation of a pexophagosome of which the outer membrane layer fuses with the vacuole where the peroxisome becomes hydrolyzed. Micropexophagy involves the uptake of a cluster of peroxisomes through direct engulfment by the vacuolar membrane (Fig. 1). Three main steps could be outlined for macropexophagy: recognition of the organelle destined for degradation, formation of the pexophagosome, and fusion with the vacuole (Fig. 1). For micropexophagy, the following steps could be distinguished: vacuolar engulfment of peroxisomes, formation of the MIPA at the peroxisomal surface, and vacuolar membrane fusion (Sakai et al., 2006).

Micropexophagy turned out to be more sensitive to a decrease of intracellular ATP compared to macropexophagy; in other words, intracellular ATP pool plays a more important role in defining the pexophagy pathway than the nature of the carbon substrate (Ano et al., 2005b). However, it is not known whether ATP concentration is the reason of the observed type of pexophagy or is the consequence of some other trigger mechanisms. In other methylotrophic yeasts, e.g. *H. polymorpha*, shift of methanol-grown cells either to glucose or ethanol leads to morphological changes described as macropexophagy. Nitrogen limitation leads in *H. polymorpha* to peroxisome degradation in by a mechanism similar to micropexophagy. However, this process occurs due to non-specific autophagic mechanism, as cytosolic components are taken up by vacuoles concomitantly with peroxisomes and therefore was named by authors as microautophagy of peroxisomes (Bellu et al., 2001b; van Zutphen et al., 2008).

During last years, genes specifically involved in macro- and micropexophagy have been identified. Gene *H. polymorpha ATG25* is specifically involved in macropexophagy. It is a coiled-coil protein and acts as the selectivity factor during macropexophagy (Monastyrska et al. 2005). This protein is located in pexophagosomes and moved there via the PAS. Atg25 is involved in the completion of sequestration of peroxisomes or in the fusion of pexophagosomes with the vacuolar membrane (Sakai et al. 2006). For the latter process, the SNARE Vam7 and the GTPase Ypt7 are also essential in *H. polymorpha* (Stevens et al., 2005).

The presence of a specific morphological structure in the micropexophagy process, the micropexophagy apparatus MIPA in *P. pastoris*, suggests the existence of specific genes and proteins participating in this process. Gene *PFK1* encodes phosphofructokinase 1 α -subunit, which is required for peroxisome engulfment by vacuoles after transferring *P. pastoris* cells from methanol medium to glucose medium (Yuan et al., 1997). Participation of phosphofructokinase 1 α -subunit in micropexophagy does not depend on its ability to phosphorylate fructose-6-phosphate since a catalytically inactive form of this enzyme provides for normal pexophagy. Moreover, the *VAC8* gene (VACuole related) was identified whose product is a 60-64 kDa protein with so called armadillo repeat that specifically participates in micro- but not macropexophagy (Fry et al., 2006; Nazarko et al., 2007a). In mutant cells, vacuolar sequestering membrane during micropexophagy is not formed. Hybrid protein Vac8-GFP is localized on vacuolar membrane independently of Atg1, Atg9, or Atg11. Deletion of repeating armadillo did not alter Vac8 localization, but the protein lost its functionality. Vac8 probably participates in early (formation of sequestering membrane) and late (membrane fusion after formation of micropexophagy apparatus) micropexophagy stages. Micropexophagy and vacuole inheritan-

ce were shown to be dependent on different Vac8 domains (Oku et al., 2006). Mutations in genes *PpGCN1*, *PpGCN2*, *PpGCN3* or *PpGCN4* involved in general amino acid control regulation, specifically inhibits micropexophagy after incorporation of the peroxisomes into the vacuole (Mukaiyama et al., 2002; Sakai et al., 2006), but detailed functions of these Gcn proteins are not clear. It is known that *GCN1* regulates translation elongation; *GCN2* encodes protein kinase and regulates translation initiation (eIF2 kinase); *GCN3* encodes for translation initiation factor (eIF2B), whereas *GCN4* encodes for basic leucine zipper (bZIP) transcriptional activator of amino acid biosynthetic genes in response to amino acid starvation. The exact functions of the mentioned genes in micropexophagy remain unknown.

The new micropexophagy specific protein Atg35, the first autophagy protein with nuclear localization, was identified during the analysis of partners interacting with protein Atg28 from *P. pastoris* (Stasyk et al., 2006). To search for such Atg proteins, a yeast two hybrid (YTH) screening system was used for the first time. YTH screening of the genome database of *P. pastoris* DNA was carried out in *S. cerevisiae* cells using PpAtg28 as “bait” (Nazarko et al., 2011). Two sequences were revealed encoding proteins Atg35 and Rdi1 (Rho GDP Dissociation Inhibitor). Atg35 consists of 463 a.a. and incorporates two putative domains: RING finger and PHD (Plant Homeo Domain). Testing *P. pastoris* mutant *atg35Δ* showed that macropexophagy is normal whereas micropexophagy is impaired. Comparison of vacuolar isolating membrane formation and the micropexophagy apparatus in wild-type and the mutant using fluorescent microscopy revealed that formation of vacuolar isolating membranes in the mutant was normal. The micropexophagy apparatus MIPA was found in *atg35Δ* cells 1.5 times less frequently than in wild-type cells, while in *atg28Δ* mutant the micropexophagy apparatus was not being formed at all. However, both mutants (*atg28Δ* and *atg35Δ*) exhibited normal formation of pexophagosomes during macropexophagy, which were not formed at all in *atg1Δ* mutant. Studying the role of Atg35 in general autophagy and Cvt pathways revealed that this protein is not required for either process. Thus, Atg35 is necessary only for micropexophagy at the stage of micropexophagy apparatus formation (Nazarko et al., 2011). It is interesting that overexpression of *ATG35* as well as deletion of this gene both inhibit micropexophagy but do not influence macropexophagy. With *ATG35* overexpression the formation of vacuolar sequestering membranes was not disturbed, while formation of the micropexophagy apparatus was blocked. However, overexpression of *ATG35* did not influence general (nonspecific) autophagy (Nazarko et al., 2011). Studying expression of genes *ATG28* and *ATG35* during peroxisome proliferation and degradation revealed that corresponding proteins

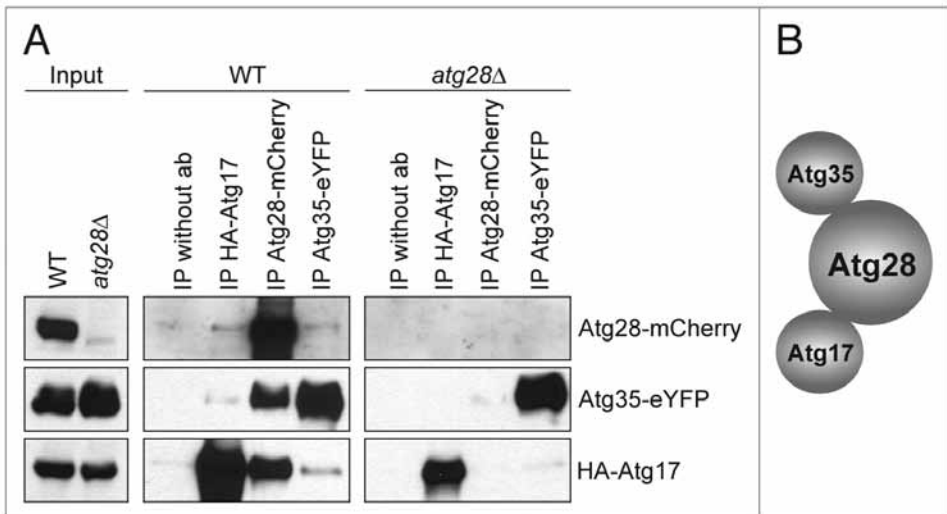


Fig. 2. Interaction between Atg35, Atg28 and Atg17. (A) co-immunoprecipitation of Atg17, Atg28 and Atg35. (B) schematic view of Atg17, Atg28 and Atg35 interactions. From: Nazarko et al., 2011

are almost completely absent in ethanol medium though they are present in significant amounts in glucose and methanol medium.

Atg35 contains putative nuclear localization signal. Testing of localization of overexpressed hybrid protein Atg35-eYFP revealed that in methanol medium it was localized in the nucleus and single dot-like structures on nuclear membrane (perinuclear structure, PNS). Transfer of cells to glucose medium caused homogenous distribution of Atg35-eYFP in the nucleus. However, combined overexpression of eCFP-Atg17 caused relocalization of Atg35-eYFP to single dot-like structures of nuclear membrane during micropexophagy. Moreover, in glucose medium Atg35-eYFP on dot-like structures of nuclear membrane colocalized with one of the eCFP-Atg17 dots. Obviously eCFP-Atg17 accumulation on nuclear membrane during micropexophagy is necessary for organization of single dot-like structures of nuclear membrane and involvement of Atg35-eYFP into this structure. Supposedly, Atg35 localization on single dot-like structures of nuclear membrane in glucose medium depends on Atg17 and is significant for the micropexophagy process.

Atg28 is known to interact with Atg17 (Nazarko et al., 2007a) and Atg35 (Nazarko et al., 2011). It was showed that interaction between Atg17 and Atg35 occurs due to Atg28 protein (Fig. 2. Figure 6, from Nazarko et al., 2011). Thus, Atg35 is the first revealed nuclear Atg protein participating in autophagy in yeasts. Deletion and overexpression of this gene lead to

specific disturbance of micropexophagy alone. Atg35 protein functions through interaction with Atg17 and Atg28, the latter protein playing a central role in this interaction (Nazarko et al., 2011).

4. Glucose sensing and signaling mechanisms and pexophagy in *H. polymorpha* and *P. pastoris*

When cells are transferred from methanol to glucose medium, micropexophagy (*P. pastoris*) or macropexophagy (*H. polymorpha*) occur. Cells in some way recognize (sense) glucose and triggers glucose signal to activate all specific to micropexophagy, other pexophagy-specific and many general autophagy Atg proteins ended by peroxisome degradation. Mechanisms of glucose sensing and signaling during (micro)pexophagy is poorly understood, especially in methylotrophic yeasts.

Below we consider available data on glucose sensing and signaling connected to pexophagy.

Sensing. Mechanisms of glucose sensing have been studied in detail in *S. cerevisiae* as glucose induces complex regulatory responses, which include induction of glucose transporters, catabolite repression of hundreds of genes, catabolite inactivation of several enzymes including proteasomal and autophagic degradation of some of them. Besides, glucose is sensed for subsequent trehalose mobilization and other responses to stress factors. Still many aspects of glucose sensing in *S. cerevisiae* remain to be elucidated. Reader is referred to corresponding reviews (Ozcan and Johnson, 1999; Santangelo, 2006; Gancedo, 2008; Rubio-Teixeira et al., 2010). Briefly speaking, there are two types of glucose sensors in *S. cerevisiae*. One is involved in glucose-dependent stress response and the other one is responsible for glucose induction and glucose catabolite repression phenomena.

Plasma membrane contains many proteins capable of glucose binding and part of them act as glucose sensors. There are 20 glucose transporters (Wieczorke et al., 1999), however, all they apparently are not involved in glucose sensing (Gancedo 2008). Specific glucose sensors can be divided in three groups. The first class of sensors comprises the classical receptor proteins or G protein-coupled receptors (GPCRs), which, in yeast, detect the presence of glucose and sucrose. It is responsible for glucose and sucrose control of the protein kinase A (PKA) pathway (Thevelein and de Winde, 1999) which plays a central role in the nutritional control of metabolism, stress resistance, cell cycle, growth, and transcription. All these properties are tightly controlled by the availability of nutrients in the medium, especially by the presence of a rapidly fermentable sugar, glucose. Addition of rapidly fermentable sugars to derepressed yeast cells triggers an immediate increase in the cAMP level, which in turn causes rapid activation of PKA, resulting in drastic changes in its multiple targets. The sugar-sensing

GPCR system consists of the receptor Gpr1 and the G α protein Gpa2 (Colombo et al., 1998). The second class of glucose sensors in *S. cerevisiae* is represented by two non-transporting transceptors Snf3 and Rgt2 which are sugar transporter homologs. High-affinity sensor Snf3 and low-affinity glucose sensor Rgt2 generate intracellular signal required for induction of hexose transporter genes in response to glucose (Gancedo, 2008). They, however, are not involved in glucose sensing for catabolite repression. The third class of glucose sensor is represented by intracellular protein, the enzyme hexokinase II Hxk2. Glucose sensing of Hxk2 depends in some way from its ability to phosphorylate glucose (Rose et al., 1991). Hxk2 sensor is involved in glucose catabolite repression; it was shown a small proportion of Hxk2 is located within the nucleus (Herrero et al., 1998) and that under conditions where Hxk2 does not enter the nucleus glucose repression does not take place. These results indicate a non-metabolic role for Hxk2 that requires a nuclear localization.

Role of GPCR sensor proteins Gpr1 and Gpa2 and non-transporting transceptors Snf3 and Rgt2 in glucose-induced pexophagy in *S. cerevisiae* has been studied. For this, the fate of peroxisomal protein thiolase involved in fatty acid β -oxidation was analyzed. This enzyme is induced in the medium with peroxisome proliferator oleic acid. Pexophagy is started after shift of the induced cells in the medium with glucose. It was shown that knock out of each *GPR1* or *GPA2* leads to strong defects in glucose-activated autophagic degradation of peroxisomal thiolase (Nazarko et al., 2008a). Knock out of *SNF3* or *RGT2* individually led to only insignificant defects in pexophagy whereas double knock out of both *SNF3* and *RGT2* resulted in practically total defect in thiolase autophagic degradation (Nazarko et al., 2008b). It was concluded that both glucose signaling components are involved in glucose sensing for pexophagy (Fig. 3; Fig. 2, from Nazarko et al., 2008). Defects in Hxk2, however, have no effects on pexophagy in *S. cerevisiae* (V. Nazarko, A. Sibirny, unpublished).

In methylotrophic yeasts, we know much less on glucose sensing and signaling. In *H. polymorpha*, two glucose sensors, Gcr1 and Hxsl, have been identified, along with glucose (hexose) transporter Hxt1 (Stasyk et al. 2004, 2008b). *P. pastoris*, on the other hand, apparently possesses only one glucose sensor, designated as Gss1 (Polupanov et al., 2011). Point or deletion mutations in *GCR1* gene of *H. polymorpha* affected glucose catabolite repression and led to constitutive presence of peroxisomes in glucose medium (Stasyk et al., 2004). However, *GCR1* gene apparently is not directly involved in pexophagy. It was observed a decrease in specific activity and protein levels of peroxisomal enzyme alcohol oxidase in *gcr1* mutant cells upon glucose adaptation, but residual alcohol oxidase levels were higher in the *gcr1* mutants relative to the wild type. However, these data do not

Glucose signaling for pexophagy in yeasts

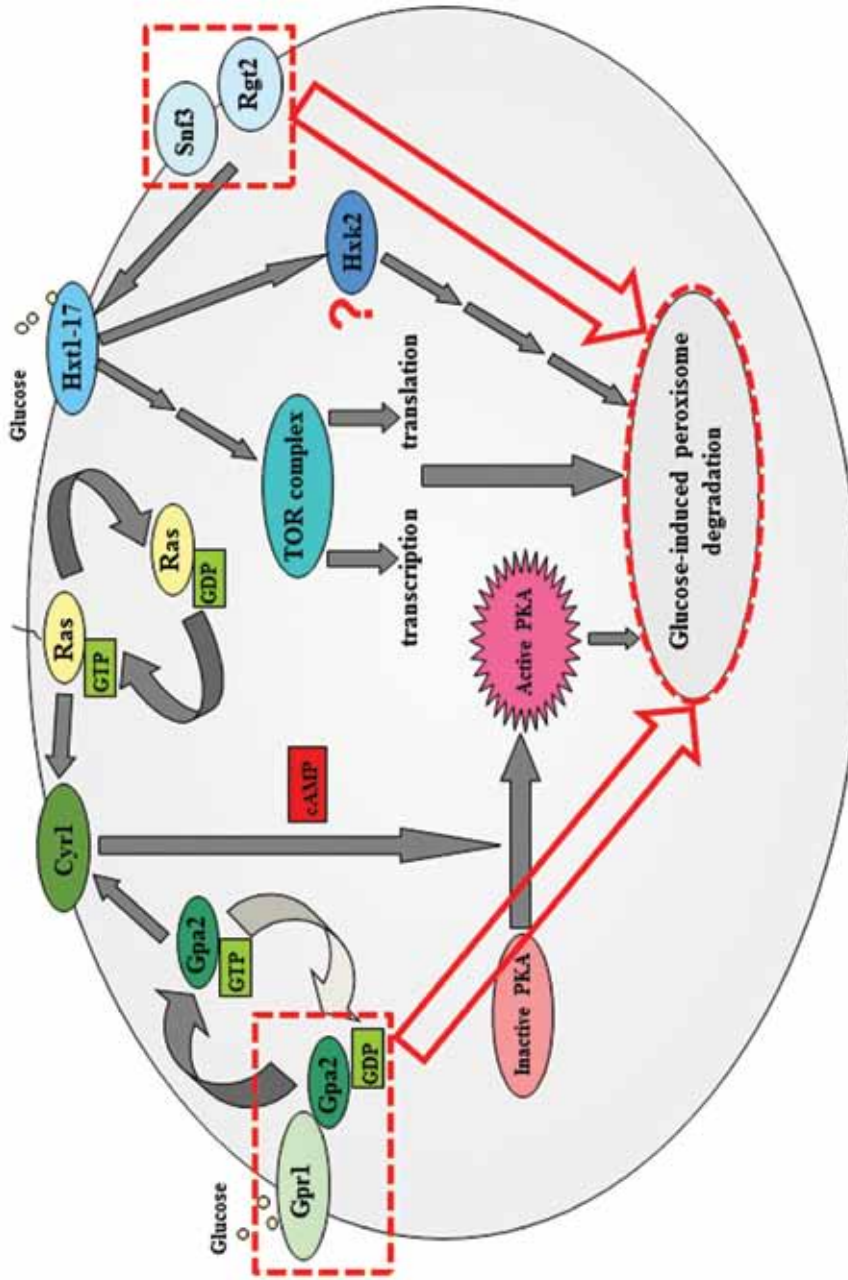


Fig. 3. Scheme of glucose signaling for pexophagy in yeasts. From Nazarko et al., 2008

demonstrate a direct involvement of Gcr1 protein in pexophagy since in *gcr1* strains, de novo peroxisome synthesis occurred due to the defect in glucose repression. A time course examination of cell morphology revealed clear signs that pexophagy proceeds in *gcr1* mutants. Some peroxisomes were observed sequestered by additional membrane layers typical for initial stages of macroautophagic peroxisome degradation in *H. polymorpha* (Veenhuis et al., 2000). Also, in *gcr1* cells with fluorescently labeled peroxisomes, the pexophagic process was evident upon glucose adaptation. Shortly after the shift, GFP fluorescence was observed in vacuoles, while in methanol-growing cells it is confined to peroxisomes. These data led to the conclusion that Gcr1 is not directly involved in pexophagy. Both point missense and deletion *gcr1* mutants continued to exhibit normal wild-type peroxisome degradation in response to ethanol.

Contrary to that, knock out mutation in another hexose sensor gene *HXS1* did not lead to defect in glucose catabolite repression and led to defect in glucose transport capacity (Stasyk et al., 2008b). To study, whether *HXS1* is involved in pexophagy, it was observed that in methanol-preincubated *hxs1Δ* cells, alcohol oxidase activity and protein level decreased upon glucose adaptation with a rate similar to that of the wild-type strain. The *H. polymorpha tup1* mutant deficient in pexophagy has been utilized as a positive control (Leao-Helder et al. 2004; Stasyk et al. 2007). When methanol-preinduced *hxs1Δ* cells were shifted to fructose or ethanol, they also did not differ in the rates of alcohol oxidase degradation from the wild-type strain. Therefore, Hxs1, similarly to Gcr1, is not essential for glucose signaling in pexophagy in *H. polymorpha*. Thus, both of identified glucose sensors in this organism are involved in several regulatory processes exerted by glucose but not in glucose recognition for pexophagy. So, the specific glucose sensor involved in glucose-induced macropexophagy in *H. polymorpha* still needs to be found.

Situation in *P. pastoris* looks differently. In this organism, orthologs of GPCR sensor proteins Gpr1 and Gpa2 and glucose transceptor sensor proteins Snf3/Rgt2 have been identified. One potential ortholog of the *GPR1* gene and one of the *GPA2* gene, that exhibit 60% and 65% similarity to their *S. cerevisiae* counterparts, respectively. Complete *GPR1* and *GPA2* open reading frames were knocked out by gene replacement method using *ScARG4* as a marker gene. Corrected knockouts of corresponding genes were confirmed by PCR. Isolated *P. pastoris Δgpr1* and *Δgpa2* mutants as well as strain SMD1163 defective in vacuolar proteases (Tuttle and Dunn, 1995) were used for studying pexophagy. Two kinds of experiments were done. In the first experiment, degradation of peroxisomal thiolase was followed after the transfer of oleate-grown cells to glucose (2%) medium, i.e., conditions exactly the same as those which were used for *S. cerevisiae*. In

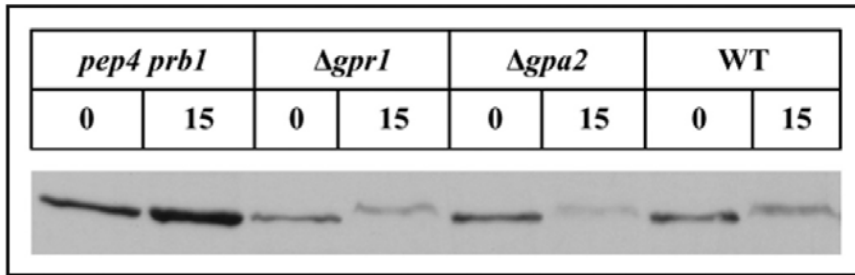


Fig. 4. Deletion of *P. pastoris* orthologs of *S. cerevisiae* *GPR1* and *GPA2* does not affect autophagy of oleate-induced peroxisomes in *P. pastoris*. From: Nazarko et al., 2008

the second experiment, cells were induced for peroxisome proliferation by incubation on methanol (0.5%) medium and then replica plated on medium with ethanol or glucose. In this case, activity of a key peroxisomal enzyme of methanol metabolism, alcohol oxidase was analyzed in situ. It was found that knockout of the putative orthologs of *GPR1* and *GPA2* in *P. pastoris* has no apparent effect on both degradation of peroxisomal thiolase and inactivation of peroxisomal alcohol oxidase (Fig. 4; Fig. 3 from Nazarko et al., 2008). These mutations also had no effect on general autophagy (Nazarko et al., 2008b). Thus, in contrast to *S. cerevisiae*, PpGpr1 and PpGpa2 are not involved in glucose signaling for pexophagy in *P. pastoris*. It is known that in contrast to *S. cerevisiae*, *Candida albicans* *GPR1* and *GPA2* are not involved in a transient cAMP burst after glucose addition (Maidan et al., 2005). Similarly PpGpr1 and PpGpa2 could be not involved in regulation of cAMP production and it looks like glucose for pexophagy is sensed in *P. pastoris* by other components of the PKA-cAMP signaling pathway or only by distinct sensors which are not involved in this pathway.

Two hexose transporters were recently identified in the yeast *P. pastoris*, Hxt1 and Hxt2, which are transcriptionally regulated by glucose. Deletion of *PpHXT1* but not *PpHXT2*, led to the expression of alcohol oxidase in glucose medium due to glucose catabolite repression impairment. However, mutant lacking PpHxt1 was normal in both respects, glucose utilization and peroxisome degradation (Zhang et al., 2010). The search for orthologs of *S. cerevisiae* glucose transceptor sensors *SNF3* and *RGT2* revealed that *P. pastoris* contains only one ortholog, designated as *GSS1* (from GlucoSe Sensor) with 57% of identity and 71% of similarity to ScSnf3, and 46% of identity and 63% of similarity to ScRgt2 (Polupanov et al., 2012). PpGss1 also reveals high level of homology to Hxs1 protein

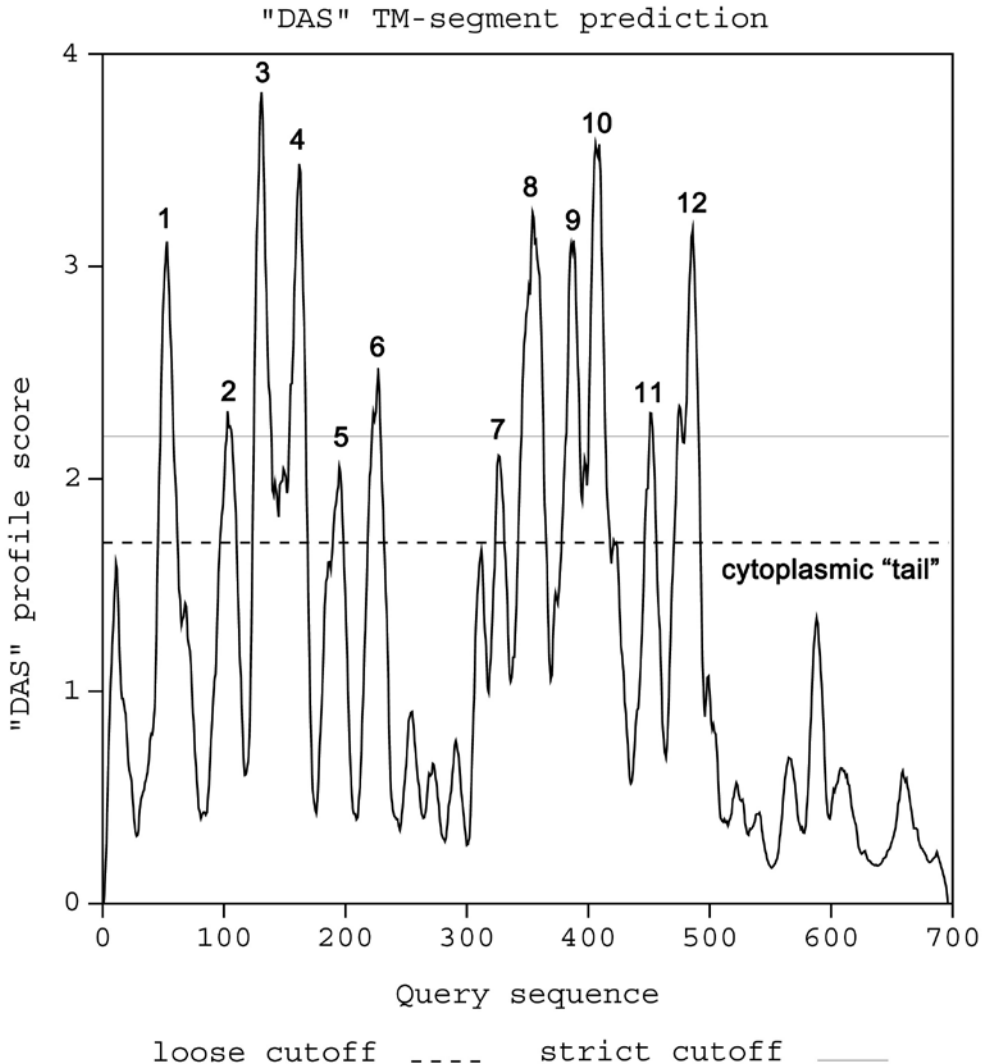


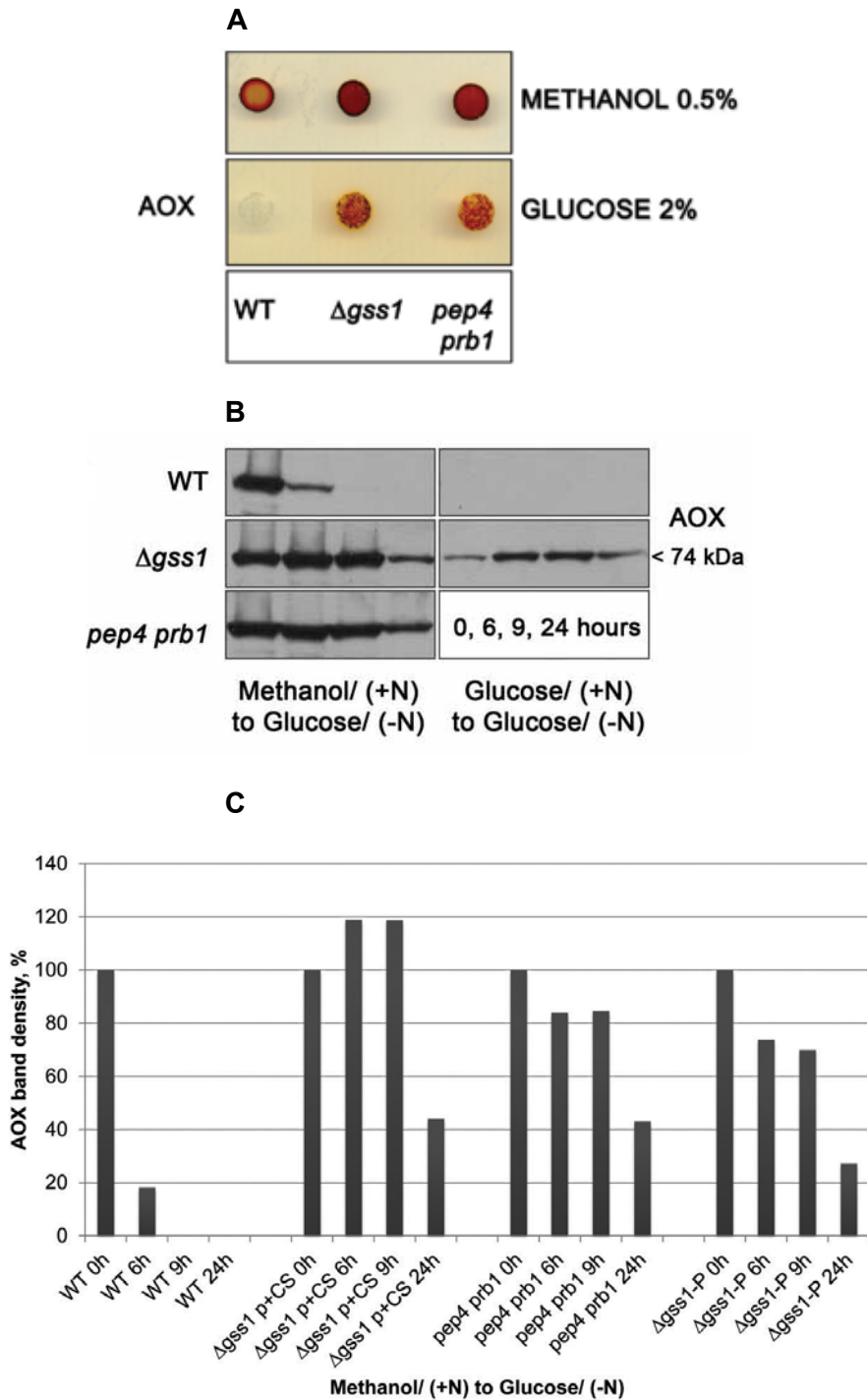
Fig. 5. Hydrophobic profile of PpGss1 protein. 12 transmembrane domains were found in PpGss1 similarly to the ScSnf3 and ScRgt2. PpGss1 has about 200 amino acid residues on the cytoplasmic C-terminus. Long cytoplasmic "tail" is the major characteristic of glucose sensors. From: Polupanov et al., 2012

of *H. polymorpha* (62% of identity and 77% of similarity). PpGss1 revealed lower homology level to HpGcr1 protein with 42% of identity and 60% of similarity. Like the *S. cerevisiae* sensors, PpGss1 possesses 12 transmembrane domains, a long C-terminal extension which is the major distinguishing characteristic for glucose sensors (Özcan et al., 1998), but lacks

of N-terminal peptide (52 amino acids) present in *S. cerevisiae* homologs (Fig. 5; Fig. 2 from Polupanov et al., 2012).

The strain with knock out of the gene *GSSI* has been constructed. The correct integration of deletion cassette into the genome of the $\Delta gssI$ knock-out strain was verified by Southern blot and PCR. In contrast to the wild-type cells, the strain without the *GSSI* gene had impaired growth for both glucose concentrations 0.1% and 2%. Incubation of the strains in the liquid glucose media revealed strong growth defect of $\Delta gssI$ mutant on 2% glucose and light growth weakening on 0.1% glucose. These results suggest a primary role of *P. pastoris* GssI as a low-affinity glucose sensor. Despite the high homology of HpHxs1 to PpGss1, the Hxs1 deficiency had a moderate effect on glucose growth and utilization in *H. polymorpha* (Stasyk et al., 2008b). Deletion of *GSSI* gene affects glucose catabolite repression in the methylotrophic yeast *P. pastoris* as was found in *H. polymorpha* mutants *gcr1* resistant to 2-deoxy-D-glucose (Stasyk et al., 2004).

Alcohol oxidase (AOX) replica plate overlay assay was used as preliminary examination of micropexophagy in $\Delta gssI$ mutant. *P. pastoris* wild-type, $\Delta gssI$ and *pep4 prb1* strains with defect of vacuolar proteinases were grown on methanol minimal medium for 2 days and then they were replica plated to glucose minimal medium to induce micropexophagy. Residual alcohol oxidase activity led to the red-colored cells on the plates with glucose indicating impairment of peroxisome degradation (Sibirny and Titorenko, 1986; Stasyk et al., 2008a). The cells of $\Delta gssI$ mutant strain, similarly to that of *pep4 prb1* mutant, showed residual alcohol oxidase activity suggesting the block of pexophagy, unlike the wild-type strain with normal inactivation of the enzyme (Fig. 6 from Polupanov et al., 2012). These results support the hypothesis that GssI is important for micropexophagy in the methylotrophic yeast *P. pastoris* (Polupanov et al., 2012). In other experiment, protein samples for Western blot analysis were prepared from the cells of *P. pastoris* wild-type, $\Delta gssI$ and *pep4 prb1* strains cultivated in methanol medium and transferred to glucose medium. For monitoring pexophagy kinetics, antibodies against *P. pastoris* alcohol oxidase were used. In the wild-type strain, level of alcohol oxidase decreased during the adaptation of the cells to glucose. Unlike the wild-type, $\Delta gssI$ mutant maintained the stable alcohol oxidase level up to 9 h of glucose adaptation. Contrary to that the wild-type cells showed no detectable alcohol oxidase band. Similarly, defect I pexophagy was observed in $\Delta gssI$ mutant after peroxisome induction with oleate instead of methanol. To validate these results, cells of *P. pastoris* were analyzed by fluorescent microscopy after the shift of methanol-grown cells into glucose medium. For this, $\Delta gssI$ and $\Delta atg1$ mutant and wild-type cells with GFP-SKL labeled peroxisomes were used. At the 6th hour of glucose adaptation the wild-type cells showed



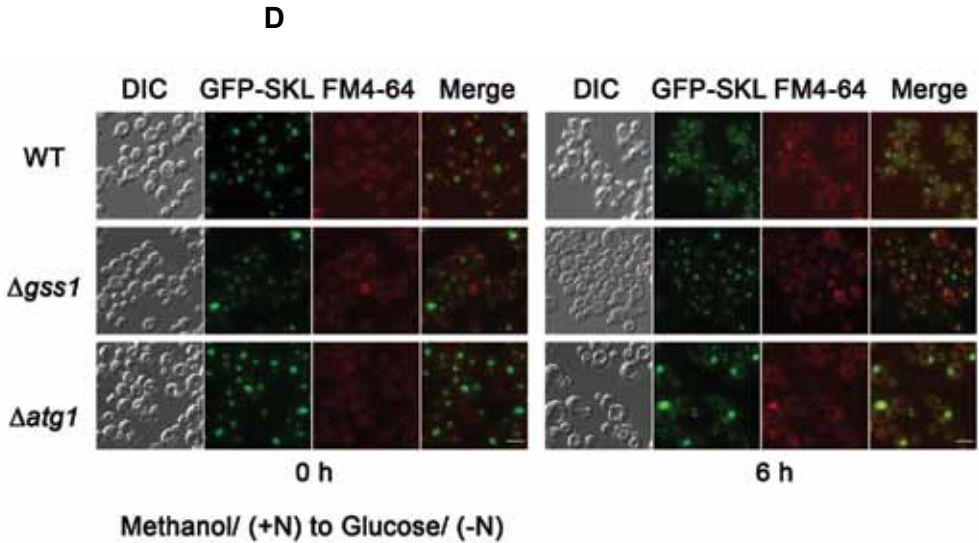


Fig. 6. The deletion of *P. pastoris* *GSS1* gene impairs micropexophagy and glucose catabolite repression. (A) Alcohol oxidase plate overlay assay. *P. pastoris* WT, $\Delta gss1$ and *pep4 prb1* strains were transferred from methanol medium to glucose medium to induce micropexophagy. Residual activity of alcohol oxidase reveals pexophagy deficiency. (B) *P. pastoris* WT, $\Delta gss1$ and *pep4 prb1* cells were induced in methanol medium and transferred to glucose medium to induce micropexophagy. (C) Alcohol oxidase bands density (in %) in WT, $\Delta gss1$ and *pep4 prb1* samples during micropexophagy. From: Polupanov et al., 2012. (D) Fluorescence microscopy studying of micropexophagy. *P. pastoris* WT (STN017), $\Delta gss1$ (SAP01) and $\Delta atg1$ (SAP02) cells with GFP-labeled peroxisomes were induced in methanol/(+N) medium and transferred to glucose/(-N) medium. After 6 h of glucose adaptation pexophagy was monitored by fluorescence microscopy. Peroxisomes were labeled with GFP-SKL and vacuolar membranes – with FM4-64

peroxisome degradation, in contrast to the $\Delta gss1$ and $\Delta atg1$ mutants possessed peroxisome clusters surrounded by the arm-like structures of vacuolar membrane typical of micropexophagy. Data showed thus that in the cells of $\Delta gss1$ mutant peroxisomes degrade via micropexophagy but much slower than in the wild-type cells. Thus, the gene *GSS1* seemed to be important for micropexophagy (Polupanov et al., 2012). During incubation of methanol-grown cells in ethanol medium, cells of $\Delta gss1$ mutant showed drop in the amount of alcohol oxidase protein, however, the process was slower than in the wild-type cells. Thus, gene *GSS1* is only partially involved in macropexophagy. Fluorescent observations supported this conclusion. It was also shown that *GSS1* is not involved in Cvt pathway and general (non-specific) autophagy (Polupanov et al., 2012).

It was found that that deletion of 150 residues of Gss1 leads to the alteration of phenotype, still maintaining signaling function of Gss1. At the same time, the substitution of one conserved amino acid R180K of Gss1 protein has no visible phenotype, in contrast to corresponding changes in glucose sensors from other yeast species. It has been suggested that C-terminal cytoplasmic extension of PpGss1 plays different role compared to that of its homologs in *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula polymorpha* (A. Polupanov and A. Sibirny, in press). Thus, the mechanism and amino acid residues responsible for glucose sensing by Gss1 protein remain to be elucidated in the future studies.

Thus, the specific homolog of glucose transporters, transceptor sensor Gss1 has been identified involved in glucose sensing for micropexophagy. It is also involved in glucose catabolite repression.

Low molecular-weight effector which triggers glucose signal for pexophagy. It is not known at the moment, which metabolite is the immediate signaling molecular initiating pexophagy signaling in glucose medium. It could be glucose or its metabolite. The observation that enzymatically inactive phosphofructokinase restored micropexophagy in glucose medium without restoration of the growth on glucose, suggests that such metabolite has to be upstream of fructose-1,6-bisphosphate (Yuan et al., 1997; Dunn et al., 2005). The study of other mutants defective in particular steps of glycolysis could help in identification of the immediate effector of pexophagy in glucose medium.

Glucose signaling for pexophagy. Mechanisms of glucose signaling in *S. cerevisiae* have been studied in detail (Santangelo, 2006; Gancedo 2008; Rubio-Teixeira et al., 2010). The scheme of glucose signaling during pexophagy in this species was provided before (Nazarko et al., 2008b). Our knowledge is quite restrictive regarding glucose signaling during pexophagy in methylotrophic yeasts. The study of thiolase and bifunctional enzyme Fox3 degradation as a peroxisomal markers showed that the Slt2 (Mpk1) mitogen-activated protein kinase (MAPK) is necessary for pexophagy but not for pexophagosome formation or other nonselective and selective forms of autophagy. It was also showed that several upstream components of its signal transduction pathway (Pkc1, Bkc1, Mkk1 and Mkk2) are also involved in glucose signaling (Manjithaya et al., 2010). MAPK Slt2 does not participate in Cvt pathway and general (non-specific) autophagy.

It was proposed that pexophagy requires the simultaneous activation of this MAPK pathway and a hexose-sensing mechanism acting through protein kinase A and cyclic adenosine monophosphate. Data, showing that orthologs of *S. cerevisiae* Mig1 and Mig2 are not apparently involved in glucose catabolite repression (Stasyk et al., 2007), suggest on possible strong differences in mechanisms of glucose signaling between baker's and methylotrophic yeasts.

The only work on studying glucose signaling in pexophagy in methylotrophic yeasts was published in the above mentioned article on the role of the α -subunit of phosphofructokinase in micropexophagy (and not in macropexophagy) in *P. pastoris* (Yuan et al., 1997). Other components of the signaling cascade remain to be elucidated in the future research.

5. Ethanol sensing for pexophagy in methylotrophic yeasts

Ethanol signaling for pexophagy apparently exists only in methylotrophic yeasts as in other yeast species used for pexophagy studies (*S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*). Ethanol does not induce pexophagy of oleate-induced peroxisomes. However, practically nothing is known on ethanol sensing in yeasts, including in *S. cerevisiae*. Nevertheless, there have to be several quite specific mechanisms of ethanol sensing and signaling. It is known that ethanol specifically and strongly induces several proteins in *S. cerevisiae*, glucokinase being induced near 25 fold (Herrero et al., 1999). In *S. cerevisiae*, ethanol represses PDC1 coding for pyruvate decarboxylase through ERA regulatory sequence (Liesen et al., 1996) and in *Kluyveromyces lactis* ethanol specifically represses the expression of *ADH3* coding for mitochondrial alcohol dehydrogenase (Saliola et al., 2007). In methylotrophic yeasts, ethanol specifically activates the repression of synthesis of the enzymes involved in methanol metabolism in addition to pexophagy (Sibirny et al., 1989). We do not know if there are specific ethanol sensors in cytoplasmic membrane, till now no such protein was reported. Possibly ethanol is sensed by some intracellular specific sensors and/or ethanol metabolizing enzymes. There are *ecr1* and *adh1* mutants of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* (*Pichia pinus* MH4) known in which ethanol is unable to repress synthesis of the peroxisomal enzymes involved in methanol catabolism (Sibirny et al., 1987; Sibirny et al., 1991). In *adh1* mutants, ethanol and methanol are utilized simultaneously and hybrid peroxisomes are produced which apparently maintain enzymes for both methanol and ethanol metabolism, whereas in *ecr1* mutants methanol is first utilized from the mixture of both alcohols. Though the genes were not isolated, *adh1* mutation apparently tagged one of alcohol dehydrogenases whereas *ECR1* gene possibly encodes protein involved in ethanol sensing.

In *P. methanolica*, attempts were made to identify a derivative of ethanol initiating pexophagy in ethanol medium. Mutants defective in distinct steps of ethanol utilization have been isolated (Tolstorukov et al., 1989; Sibirny et al., 1990). It was found that pexophagy was affected in mutants *icl1* defective in isocitrate lyase suggesting that isocitrate is immediate ethanol metabolite initiating pexophagy.

Thus, the mechanisms of sensing and signaling in glucose- and ethanol-induced pexophagy in yeast, in general, and methylotrophic yeasts, in

particular, are far from understanding. At this moment, we do not know exact glucose sensors and components of signal transmitting to pexophagy machinery. In the case of ethanol-induced pexophagy, our knowledge is at the initial stage. It could be envisaged that studies in this field will be more active in the nearest future and we will have soon the mechanistical picture of pexophagy sensing and signaling by glucose and ethanol in methylotrophic yeasts.

Acknowledgements

The work in the field of pexophagy in the autor's laboratory was supported by grant N F46.1/012 from the State Foundation for Basic Research «Key State Laboratory of Molecular and Cellular Biology», Ukraine.

References

1. Aksam E. B., Koek A., Kiel J. A. et al. A peroxisomal lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of *Hansenula polymorpha* cells // Autophagy. – 2007. – **3**. – P. 96–105.
2. Aksam E. B., de Vries B., van der Klei I. J. et al. Preserving organelle vitality: peroxisomal quality control mechanisms in yeast // FEMS Yeast Res. – 2009. – **9**. – P. 808–820.
3. Ano Y., Hattori T., Oku M. et al. A sorting nexin PpAtg24 regulates vacuolar membrane dynamics during pexophagy via binding to phosphatidylinositol-3-phosphate // Mol. Biol. Cell. – 2005a. – **16**. – P. 446–457.
4. Ano Y., Hattori T., Kato N. et al. Intracellular ATP correlates with mode of pexophagy in *Pichia pastoris* // Biosci Biotechnol Biochem. – 2005b. – **69**. – P. 1527–1533.
5. Baerends R. J., Rasmussen S. W., Hilbrands R. E. et al. The *Hansenula polymorpha* PER9 gene encodes a peroxisomal membrane protein essential for peroxisome assembly and integrity // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**. – P. 8887–8894.
6. Bellu A. R., Komori M., van der Klei I. J. et al. Peroxisome biogenesis and selective degradation converge at Pex14p // J. Biol. Chem. – 2001a. – **276**. – P. 44570–44574.
7. Bellu A. R., Kram A. M., Kiel J. A. et al. Glucose-induced and nitrogen-starvation-induced peroxisome degradation are distinct processes in *Hansenula polymorpha* that involve both common and unique genes // FEMS Yeast Res. – 2001b. – **1**. – P. 23–31.
8. Bellu A. R., Salomons F. A., Kiel J. A. et al. Removal of Pex3p is an important initial stage in selective peroxisome degradation in *Hansenula polymorpha* // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**. – P. 42875–42880.
9. Brooke A. G., Dijkhuizen L., Harder W. Regulation of flavin biosynthesis in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Arch. Microbiol. – 1986. – **145**. – P. 62–70.
10. Brown L. A., Baker A. Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (Review) // Mol. Membr. Biol. – 2008. – **25**. – P. 363–375.

11. Colombo *et al.* 1998
12. Cregg J. M., Tolstorukov I., Kusari A. *et al.* Expression in the yeast *Pichia pastoris* // Methods Enzymol. – 2008. – **463**. – P. 169–189.
13. Dunn W. A. Jr., Cregg J. M., Kiel J. A. *et al.* Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes // Autophagy. – 2005. – **1**. – P. 75–83.
14. Faber K. N., Harder W., Ab G. *et al.* Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins // Yeast. – 1995. – **11**. – P. 1331–1344
15. Farre J. C., Subramani S. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process // Trends Cell Biol. – 2004. – **14**. – P. 515–523.
16. Farré J. C., Manjithaya R., Mathewson R. D., Subramani S. PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy // Dev. Cell. – 2008. – **14**. – P. 365–376.
17. Farré J. C., Krick R., Subramani S. *et al.* Turnover of organelles by autophagy in yeast // Curr. Opin. Cell Biol. – 2009. – **21**. – P. 522–530.
18. Fry M. R., Thomson J. M., Tomasini A. J. *et al.* Early and late molecular events of glucose-induced pexophagy in *Pichia pastoris* require Vac8 // Autophagy. – 2006. – **2**. – P. 280–288.
19. Gancedo J. M. The early steps of glucose signalling in yeast // FEMS Microbiol. Rev. – 2008. – **32**. – P. 673–704.
20. Hazra P. P., Suriapranata I., Snyder W. B. *et al.* Peroxisome remnants in *pex3*-delta cells and the requirement of Pex3p for interactions between the peroxisomal docking and translocation subcomplexes // Traffic. – 2002. – **3**. – P. 560–574.
21. Herrero P., Martínez-Campa C., Moreno F. The hexokinase 2 protein participates in regulatory DNA-protein complexes necessary for glucose repression of the *SUC2* gene in *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Lett. – 1998. – **434**. – P. 71–76.
22. Herrero P., Flores L., de la Cera T. *et al.* Functional characterization of transcriptional regulatory elements in the upstream region of the yeast *GLK1* gene // Biochem. J. – 1999. – **343**. – P. 319–325.
23. Kiel J. A. Autophagy in unicellular eukaryotes // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2010. – **365**. – P. 819–830.
24. Lahtchev K. L., Semenova V. D., Tolstorukov I. I. *et al.* Isolation and properties of genetically defined strains of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* CBS4732 // Arch. Microbiol. – 2002. – **177**. – P. 150–158.
25. Lanyon-Hogg T., Warriner S. L., Baker A. Getting a camel through the eye of a needle: the import of folded proteins by peroxisomes // Biol. Cell. – 2010. – **102**. – P. 245–263.
26. Leão-Helder A. N., Krikken A. M., Lunenborg M. G. *et al.* *Hansenula polymorpha* Tup1p is important for peroxisome degradation // FEMS Yeast Res. – 2004. – **4**. – P. 789–794.
27. Liesen T., Hollenberg C. P., Heinisch J. J. ERA, a novel cis-acting element required for autoregulation and ethanol repression of *PDC1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Microbiol. – 1996. – **21**. – P. 621–632.
28. Ma C., Subramani S. Peroxisome matrix and membrane protein biogenesis // IUBMB Life. – 2009. – **61**. – P. 713–722.

29. Maidan M. M., De Rop L., Serneels J. et al. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the G α protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans* // Mol. Biol. Cell. – 2005. – **16**. – P. 1971–1986.
30. Marelli M., Smith J. J., Jung S. et al. Quantitative mass spectrometry reveals a role for the GTPase Rho1p in actin organization on the peroxisomemembrane // J. Cell Biol. – 2004. – **167**. – P. 1099–1112.
31. Manjithaya R., Nazarko T. Y., Farré J. C. et al. Molecular mechanism and physiological role of pexophagy // FEBS Lett. – 2010. – **584**. – P. 1367–1373.
32. Mast F. D., Fagarasanu A., Knoblach B. et al. Peroxisome biogenesis: something old, something new, something borrowed // Physiology (Bethesda). – 2010. – **25**. – P. 347–356.
33. Meijer WH, Gidijala L, Fekken S et al. Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – **76**. – P. 5702–5709.
34. Michels P. A., Moyersoer J., Krazy H. et al. Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes (review) // Mol. Membr. Biol. – 2005. – **22**. – P. 133–145.
35. Michels P. A. M., Bringaud F., Herman M. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids // Biochim Biophys Acta. – 2006. – **1763**. – P. 1463–1477
36. Monastyrska I., Kiel J. A., Krikken A. M. et al. The *Hansenula polymorpha* ATG25 gene encodes a novel coiled-coil protein that is required for macropexophagy // Autophagy. – 2005. – **1**. – P. 92–100.
37. Mukaiyama H., Oku M., Baba M. et al. Paz2 and 13 other PAZ gene products regulate vacuolar engulfment of peroxisomes during micropexophagy // Genes Cells. – 2002. – **7**. – P. 75–90.
38. Mukaiyama H., Baba M., Osumi M. et al. Modification of a ubiquitin-like protein Paz2 conducted micropexophagy through formation of a novel membrane structure // Mol. Biol. Cell. – 2004. – **15**. – P. 58–70.
39. Nazarko T. Y., Polupanov A. S., Manjithaya R. R. et al. The requirement of sterol glucoside for pexophagy in yeast is dependent on the species and nature of peroxisome inducers // Mol. Biol. Cell. – 2007a. – **18**. – P. 106–118.
40. Nazarko T. Y., Farré J. C., Polupanov A. S. et al. Autophagy-related pathways and specific role of sterol glucoside in yeasts // Autophagy. – 2007b. – **3**. – P. 263–265.
41. Nazarko V. Y., Thevelein J. M., Sibirny A. A. G-protein-coupled receptor Gpr1 and G-protein Gpa2 of cAMP-dependent signaling pathway are involved in glucose-induced pexophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Cell Biol. Int. – 2008a. – **32**. – P. 502–504.
42. Nazarko V. Y., Futej K. O., Thevelein J. M. et al. Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // Autophagy. – 2008b. – **4**. – P. 381–384.
43. Nazarko T. Y., Farré J. C., Subramani S. Peroxisome size provides insights into the function of autophagy-related proteins // Mol. Biol. Cell. – 2009. – **20**. – P. 3828–3839.

44. Nazarko V. Y., Nazarko T. Y., Farré J. C. et al. Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris* // Autophagy. – 2011. – 7. – P. 375–385.
45. Oku M., Warnecke D., Noda T. et al. Peroxisome degradation requires catalytically active sterol glucosyltransferase with a GRAM domain // EMBO J. – 2003. – 22. – P. 3231–3241.
46. Oku M., Nishimura T., Hattori T. et al. Role of Vac8 in formation of the vacuolar sequestering membrane during micropexophagy // Autophagy. – 2006. – 2. – P. 272–279.
47. Ozcan S., Dover J., Johnston M. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // EMBO J. – 1998. – 17. – P. 2566–2573.
48. Ozcan S., Johnston M. Function and regulation of yeast hexose transporters // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1999. – 63. – P. 554–569.
49. Polupanov A. S., Nazarko V. Y., Sibirny A. A. CCZI, MON1 and YPT7 genes are involved in pexophagy, the Cvt pathway and non-specific macroautophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // Cell Biol. Int. – 2011. – 35. – P. 311–319.
50. Polupanov A. S., Nazarko V. Y., Sibirny A. A. Gss1 protein of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is involved in glucose sensing, pexophagy and catabolite repression // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2012. – 44. – P. 1906–1918.
51. Rose M., Albig W., Entian K. D. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII // Eur. J. Biochem. – 1991. – 199. – P. 511–518.
52. Rubio-Teixeira M., Van Zeebroeck G., Voordeckers K. et al. *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane nutrient sensors and their role in PKA signaling // FEMS Yeast Res. – 2010. – 10. – P. 134–149.
53. Sakai Y., Oku M., van der Klei I. J. et al. Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – 1763. – P. 1767–1775.
54. Sakai Y., Koller A., Rangell L. K. et al. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates // J. Cell Biol. – 1998. – 141. – P. 625–636.
55. Saleem R. A., Smith J. J., Aitchison J. D. Proteomics of the peroxisome // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – 1763. – P. 1541–1551.
56. Saleem R. A., Knoblach B., Mast F. D. et al. Genome-wide analysis of signaling networks regulating fatty acid-induced gene expression and organelle biogenesis // J. Cell Biol. – 2008. – 181. – P. 281–292.
57. Saliola M., Getuli C., Mazzoni C. A new regulatory element mediates ethanol repression of KIADH3, a *Kluyveromyces lactis* gene coding for a mitochondrial alcohol dehydrogenase // FEMS Yeast Res. – 2007. – 7. – P. 693–701.
58. Santangelo G. M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2006. – 70. – P. 253–282.
59. Schrader M., Fahimi H. D. The peroxisome: still a mysterious organelle // Histochem. Cell Biol. – 2008. – 129. – P. 421–440.
60. Sibirny A. A. Mechanisms of autophagy and pexophagy in yeasts // Biochemistry (Moscow). – 2011. – 76. – P. 1279–1290.

61. Sibirny A. A. Molecular mechanisms of peroxisome biogenesis in yeasts // Mol. Biol. (Moscow). – 2012. – **46**. – P. 11–26.
62. Sibirny A. A., Titorenko V. I. The method for qualitative assay of alcohol oxidase and catalase in yeast colonies // Ukr. Biokhim. Zhurn. – 1986. – **58**. – P. 65–68 (in Russian).
63. Sibirny A. A., Titorenko V. I., Efremov B. D. et al. Multiplicity of mechanisms of carbon catabolite repression involved in the synthesis of alcohol oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia pinus* // Yeast. – 1987. – **3**. – P. 233–241.
64. Sibirny A. A. Genetic control of methanol and ethanol metabolism in the yeast *Pichia pinus*. In: Proc. 6th Intern. Symp. on Genetics of Industrial Microorganisms. Stasbourg, France. Ed. by H. Heslot. Soc. Franc. Microbiol., 1990. – **1**. – P. 545–554.
65. Sibirny A. A., Titorenko V. I., Teslyar G. E. et al. Methanol and ethanol utilization in methylotrophic yeast *Pichia pinus* wild-type and mutant strains // Arch. Microbiol. – 1991. – **156**. – P. 455–462.
66. Smith J. J., Marelli M., Christmas R. H. et al. Transcriptome profiling to identify genes involved in peroxisome assembly and function // J. Cell Biol. – 2002. – **158**. – P. 259–271.
67. Stasyk O. V., Nazarko T. Y., Stasyk O. G. et al. Sterol glucosyltransferases have different roles in *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica* // Cell Biol. Int. – 2003. – **27**. – P. 947–952.
68. Stasyk O. V., Stasyk O. G., Komduur J. et al. A hexose transporter homologue controls glucose repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**. – P. 8116–8125.
69. Stasyk O. V., Stasyk O. G., Mathewson R. D. et al. Atg28, a novel coiled-coil protein involved in autophagic degradation of peroxisomes in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // Autophagy. – 2006. – **2**. – P. 30–38.
70. Stasyk O. G., van Zutphen T., Kang H. A. et al. The role of *Hansenula polymorpha* *MIG1* homologues in catabolite repression and pexophagy // FEMS Yeast Research. – 2007. – **7**. – P. 1103–1013.
71. Stasyk O. V., Nazarko T. Y., Sibirny A. A. Methods of plate pexophagy monitoring and positive selection for *ATG* gene cloning in yeasts // Methods Enzymol. – 2008a. – **451**. – P. 229–239.
72. Stasyk O. G., Maidan M. M., Stasyk O. V. et al. Identification of hexose transporter-like sensor *HXS1* and functional hexose transporter *HXT1* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Eukaryot. Cell. – 2008b. – **7**. – P. 735–746.
73. Steinberg S. J., Dodt G., Raymond G. V. Peroxisome biogenesis disorders // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – **1763**. – P. 1733–1748.
74. Stevens P., Monastyrska I., Leão-Helder A. N. et al. *Hansenula polymorpha* Vam7p is required for macropexophagy // FEMS Yeast Res. – 2005. – **5**. – P. 985–997.
75. Subramani S. *PEX* genes on the rise // Nat. Genet. – 1997. – **15**. – P. 331–333.
76. Subramani S. Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement // Physiol. Rev. – 1998. – **78**. – P. 171–188.

77. Suzuki K. Selective autophagy in budding yeast // Cell Death Differ. – 2013. – **20**. – P. 43–48.
78. Thevelein J. M., de Winde J. H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Microbiol. – 1999. – **33**. – P. 904–918.
79. Till A., Lakhani R., Burnett S. F., Subramani S. Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes // Int. J. Cell Biol. – 2012. – **2012**. – P. 512721.
80. Tolstorukov I. I., Efremov B. D., Benevolensky S. V. et al. Mutants of methylotrophic yeast *Pichia pinus* defective in C2 metabolism // Yeast. – 1989. – **5**. – P. 179–186.
81. Tolstorukov I., Cregg J. M. Classical genetics// Methods Mol. Biol. – 2007. – **389**. – P. 189–202.
82. Tuttle D. L., Dunn W. A. Jr. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // J. Cell Sci. – 1995. – **108**. – P. 25–35.
83. van der Klei I. J., Yurimoto H., Sakai Y. et al. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – **1763**. – P. 1453–1462.
84. van Zutphen T., van der Klei I. J., Kiel J. A. Pexophagy in *Hansenula polymorpha* // Methods Enzymol. – 2008. – **451**. – P. 197–215.
85. Veenhuis M., Van Dijken J.P., Harder W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts // Adv. Microb. Physiol. – 1983. – **24**. – P. 1–82.
86. Veenhuis M., Salomons F. A., van der Klei I. J. Peroxisome biogenesis and degradation in yeast: a structure/function analysis // Microsc. Res. Tech. – 2000. – **51**. – P. 584–600.
87. Wan Y., Saleem R. A., Ratushny A. V. et al. Role of the histone variant H2A.Z/Htz1p in TBP recruitment, chromatin dynamics, and regulated expression of oleate-responsive genes // Mol. Cell. Biol. – 2009. – **29**. – P. 2346–2358.
88. Wanders R. J., Duran M., Loupatty F. J. Enzymology of the branched-chain amino acid oxidation disorders: the valine pathway // J. Inherit. Metab. Dis. – 2010. – **35**. – P. 5–12.
89. Wieczorke R., Krampe S., Weierstall T. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae* // FEBS Lett. – 1999. – **464**. – P. 123–128.
90. Yamashita S., Oku M., Wasada Y. et al. PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy // J. Cell Biol. – 2006. – **173**. – P. 70–717.
91. Yokota S. Degradation of normal and proliferated peroxisomes in rat hepatocytes: regulation of peroxisomes quantity in cells // Microsc. Res. Tech. – 2003. – **61**. – P. 151–160.
92. Yuan W., Tuttle D. L., Shi Y. J. Glucose-induced microautophagy in *Pichia pastoris* requires the alpha-subunit of phosphofructokinase // J. Cell Sci. – 1997. – **110**. – P. 1935–1945.
93. Zhang P., Zhang W., Zhou X. et al. Catabolite repression of Aox in *Pichia pastoris* is dependent on hexose transporter PpHxt1 and pexophagy // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – **76**. – P. 6108–6118.

SWEET TASTE OF CELL DEATH: ROLE OF CARBOHYDRATE RECOGNITION SYSTEMS

Rostyslav BILYY, Rostyslav STOIKA

*Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv;
e-mail: r.bilyy@nas.gov.ua; stoika@cellbiol.lviv.ua*

This paper describes a complicated way how the glycoepitops' alterations on a surface of dying cells allow investigators to decipher specific mechanisms underlying cell restructuring at apoptosis. These glycoepitops are important at removal of fragments of dying cells from the body, which can be a cause of formation of the auto-antibodies.

The number of cellular and molecular markers of apoptosis described in cytoplasm, nucleus and mitochondria, is increasing yearly. However, up to recent time, plasma membrane (PM) markers stayed to be less studied [1], and only phosphatidylserine (PS) externalization has been well characterized in that compartment, and already proposed for application in biology studies and medical diagnostics [2]. It should be stressed that PM markers of apoptosis possess some important advantages compared to all other markers of this phenomenon, since they are better accessible to extra-cellular interactions without disturbing cell integrity. Since PM markers of apoptotic cells can be recognized by the phagocytic and neighboring epithelial cells, they are very important for efficient elimination of apoptotic cells from tissues and organs. Cell death was shown to be accompanied by time-dependent sequence of intracellular events, starting with a trigger signal and ending with a complete removal of dying cells by their neighbors and macrophages. It is discussed since when one can consider the cell "dead" or "apoptotic". The organism senses the dying cells by a change of their surface markers and by a release of particular intercellular molecules [3] also related to changes in plasma membrane. Thus, the PM-derived apoptosis markers seem to be the most "physiological" measure of whether the cell is alive, dying, or already dead (necrotic).

Recently, glycoproteins (GPs) integrated in the PM of apoptotic cells, were addressed by the investigators searching for novel cell surface markers of apoptosis. The carbohydrate moiety of plasma membrane GPs, unlike the DNA or proteins, does not need a specific matrix for its synthesis. Besides, unlike 3'→5' phosphodiester bonds in DNA, or peptide bonds in proteins, two carbohydrate molecules can be joined together by eleven different bond combinations providing a huge number of possible oligosaccharides and much higher information potential that is perfectly described by H.-J. Gabius [4].

Carbohydrate binding proteins, the lectins, have demonstrated to be a powerful tool for recognizing different carbohydrate moieties. They were discovered over 100 years ago, and hundreds of lectins with various carbohydrate specificity and different functions were described in plants and animals [5, 6]. A principal function of lectin-carbohydrate interaction is well expressed at the immune response [7, 8], including autoimmunity [9], and cell elimination from the organism [10]. It was hypothesized [11], that such interaction could be an evolutionary ancestor of the antibody-antigen interaction.

A historical sketch [12]

In 1972, Kerr et al. [13] firstly described a new biological that phenomenon named apoptosis or programmed cell death. Initially, apoptosis was mainly characterized by morphological changes in the cell, however, later, a set of specific biochemical events was discovered to take place at apoptosis. In 1985, Duvall et al. [14] found that N,N'-diacetyl chitobiose, NAcGlc, and NAcGal inhibited interaction of mouse macrophages with the apoptotic thymocytes, and lectin-like molecule was shown as a proper mediator of such interaction. Although the apoptotic and non-apoptotic cells did not differ in relative amount of exposed Gal, NAcGal, NAcGlc or NAcNeu, the lectin-binding sites were less abundant on the apoptotic cell surface [15]. In 1992, Dini and co-authors [16] showed that recognition of apoptotic hepatocytes in primary culture was mediated by the asialoglycoprotein receptor. Soon, Hall et al. [17] reported about the existence of two mechanisms of recognition of apoptotic neutrophils (PMNs) by the fibroblasts, first – via the vitronectin receptor involving the ingestion of apoptotic neutrophils by the macrophages, and second - via the mannose/fucose-specific lectin that is not responsible for phagocytosis of the apoptotic PMNs by the macrophages. The inhibition of adherence of apoptotic bodies to sinusoidal endothelial cells of liver was achieved by Gal/NAcGal/Man [18], thus, suggesting presence of carbohydrate-specific receptors in such interaction, and cell clearance was shown to be enhanced by interleukin-1 in that cellular system. The inhibitory action of specific carbohydrates towards phagocytosis of the apoptotic human Kupffer cells was also demonstrated [19].

In 1992, Fadok et al. [2] detected that phosphatidyl-L-serine (PS) exposure on the apoptotic leukocytes is important for their recognition by the macrophages and further clearance by these immune cells. Soon, the ability to recognize PS was proposed to be a universal feature of macrophages, and the mechanism of translocation of this phospholipid from the inner to outer layer of plasma membrane was suggested [20–22]. That also permitted introducing Annexin V as PS-specific binding agent

[23, 24]. A key role of interaction of PS with cell recognizing systems was shown in modulating the immune response triggered by the dying cells [25, 26]. Targeting this interaction was found to be effective in inducing immune response against tumor cells via immunization with autologous apoptotic tumor cells [27, 28].

In 1999, Rapoport and Le Pendu [29] addressed a question regarding changes in glycan determinants of plasma membrane. The results of analysis of six colon carcinoma cell lines have demonstrated that UV-induced apoptosis was accompanied by a decrease in binding 2,3-sialil-specific MAA (*Maackia amurensis*) lectin. It was shown that 4 of 6 studied carcinoma cell lines expressed relatively small number of PNA lectin-binding targets which were specific to desialylated glycoepitops, and gained high amount of those targets during apoptosis. An increase in binding of fucose-specific UEA-I (*Ulex europaeus* I) lectin to the apoptotic cells was also observed. That was accompanied by a decrease in α 1,2-fucosyltransferase activity, while the activity of α 1,3-fucosyltransferase was inhibited during the UV-induced apoptosis and it was increased 2.5-fold during apoptosis induced by the anti-Fas.

Screening of plasma membrane glycoproteins

In 2003, we [30] and another group of investigators [31] independently proposed a similar lectin-based approach for detecting apoptotic cells which demonstrated changes in GPs pattern of PM at apoptosis. For comparing an expression of PM glycoproteins in intact and apoptotic cells, we have used a big set of peroxidase- and fluorescent dye (FITC)-labeled lectins. It was found that α -D-mannose specific lectins from *Pisum sativum* (PSL), *Polygonatum multiflorum* rhizome, D-mannose-specific (PMRL), *Galanthus nivalis* (GNA), and *Narcissus pseudonarcissus* (NPL) were better bound to the apoptotic cells than to the intact cells. β -D-galactose specific lectins isolated from *Ricinus communis* (RCA) and *Viscum album* (VAA), were also better bound to the apoptotic cells [32]. At the same time, binding of α 2,3-sialic-specific MAA-II lectin with the surface of apoptotic cells was decreased (demonstrated by Azuma et al. [33], Batisse et al. [34], as well as our group [35]). Similar apoptosis-related decrease in binding of α 2,6-sialil-specific lectin SNA isolated from *Sambucus nigra*, was shown in U-937 cells [34], but not in Jurkat T-cells [33]. Herrmann's group [36] found that both apoptotic and necrotic dying cells were selectively bound by non-toxic lectins isolated from *Griffonia simplicifolia* II (GSL II), UEA-I and NPL. Those investigators also showed that apoptosis was accompanied by a loss of resistance of PM against acid treatment, leading to an exposition of binding targets of α -Man-specific NPL lectin on cell surface. Thus, level of cell staining with NPL can be a reliable marker of apoptosis, "at

least as sensitive as Annexin V binding assay”, with a correlation coefficient between two methods counted for $R^2 = 0.7249$ [31].

To identify GPs whose expression was changed during apoptosis, we isolated PM fraction, and then carried out lectin-affinity chromatography and high resolution electrophoresis in a gradient PAAG. GPs were also separated into integral and peripheral ones by means of Triton-X114 assay and gradient PAGE, and then subjected to lectin-blot-analysis. It was found that the GPs of interest were both integral and peripheral components of PM. MALDI-TOF study [37] revealed that they could participate in cell signaling (specific G-protein beta-subunit-like protein) and apoptosis signaling pathways (article in preparation), as well as in cytoskeleton functioning (dynein heavy chain, microtubule-actin cross-linking factor, dystonin isoform β). The AMID protein (apoptosis-inducing factor (AIF)-like mitochondrion-associated inducer of death) was identified by the MALDI-TOF mass spectrometry as a protein isolated by *Pisum sativum* lectin-affinity chromatography from PM fraction of the apoptotic murine leukemia L1210 cells, and was lacking in the intact L1210 cells. The obtained results suggest its possible glycosylation that was further suggested by finding N-glycosylation sequence in the signal peptide of AMID protein (*in silico*), and by predicting trans-membrane localization of its N-terminal part. By using monoclonal antibodies to AMID, we demonstrated an elevated expression of the AMID in human leukemia Jurkat T-cells after apoptosis induction. Immunocytochemical study suggested its association with cell PM at apoptosis [38].

Altered glycosylation at apoptotic cell death

The mechanism(s) of modification of the glycocalyx remain unclear. During apoptosis, the cells might change the glycosylation of *de novo* synthesized glycoconjugates. Alternatively, mature GP might get modified by glycosidases (e.g. sialidases) *in situ*. Secondly, internal membranes containing immature glycoproteins (GP) might be exposed.

To analyze the mechanisms modifying the glycocalyx, we blocked at several steps the regular synthesis pathway for N-glycans of GP and gangliosides. It was found that the inhibitors of transcription [actinomycin D], translation [cycloheximide], N-glycan synthesis in the ER [tunicamycin, 2-deoxy-D-glucose], and export from Golgi to PM [monensin] did not prevent an increased exposure of galactose/mannose and decreased exposure of sialic acid, as we showed earlier [39]. Thus *de novo* glycoprotein synthesis was excluded as a potential contributor to altered surface glycoprofile at apoptosis.

However, neuraminidase inhibitor DANA (2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid) prevented the phenomenon of altered glycoepitop

redistribution at apoptosis via blocking both a decrease in sialic acid and increase in galactose-rich residues. These results suggest an involvement of sialidase enzymes in modification of cell surface.

Sialidases are enzymes that trim terminal sialic acids from a range of substrates, including the glycoconjugates of PM. Changes in the activity of all known human sialidases were shown during tumorigenesis [40], and the level of surface sialylation was shown to be tightly connected with tumor cell invasiveness and metastatic potential [40]. Sialylation level also determines the clearance of aged or virus-infected cells. Thus, detection of neuraminidase activity is of primary importance for clinical diagnostics, as well as life science research. The ubiquity of sialic acids, diversity of cellular and viral neuraminidases [41], the absence of specific antibodies make problematic a detection of neuraminidases. Most of available methods for neuraminidase activity detection are based on chemical essays. Unfortunately, all of them have 2 principal disadvantages: their sensitivity is rather low and they are designed for cellular extracts and can not be utilized for direct detection of enzymatic activity in specific cellular compartment [42].

We proposed utilizing fluorescent neuraminidase substrate, 4-MUNA (2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid) and developed a method that is based on using fluorescent and confocal microscopy. That solved both problems of sialidase detection described above, and both strong signal of the enzymatic activity and information on its intracellular cellular localization were obtained [43, 44]. Using this approach permitted demonstrating an increase in sialidase activity in apoptotic cells comparing to viable and primary necrotic cells.

Fluorometric assay for sialidase activity revealed its significant increase in the apoptotic cells, starting as early as 2 hours after the action of apoptosis-inducing agent, and this was true when we studied both cell lysates and cell suspensions. When cells were placed into a solution containing sialidase substrate, we were able to observe under the fluorescent microscope the fluorescence of cleaved sialidase substrate on cell surface (Fig. 1). Since the substrate or products of its hydrolysis were not membrane-permeable, we supposed that increased sialidase activity at apoptosis was localized on cell PM. That suggestion was further supported by the results of using RBC agglutination assay with PNA lectin agglutinating cells with desialylated residues [45]. Our experiments also demonstrated that upon permeabilization one can use the proposed approach to detect sialidase activity in the intracellular compartments also [44].

Confocal scanning microscopy, as well as DIC microscopy, allowed detecting sialidase activity and simultaneous detection of Annexin V-FITC and PI binding. Sialidase substrate (as it is quite soluble) accumulated with time both on the cell surface and in the medium, leading to an increased

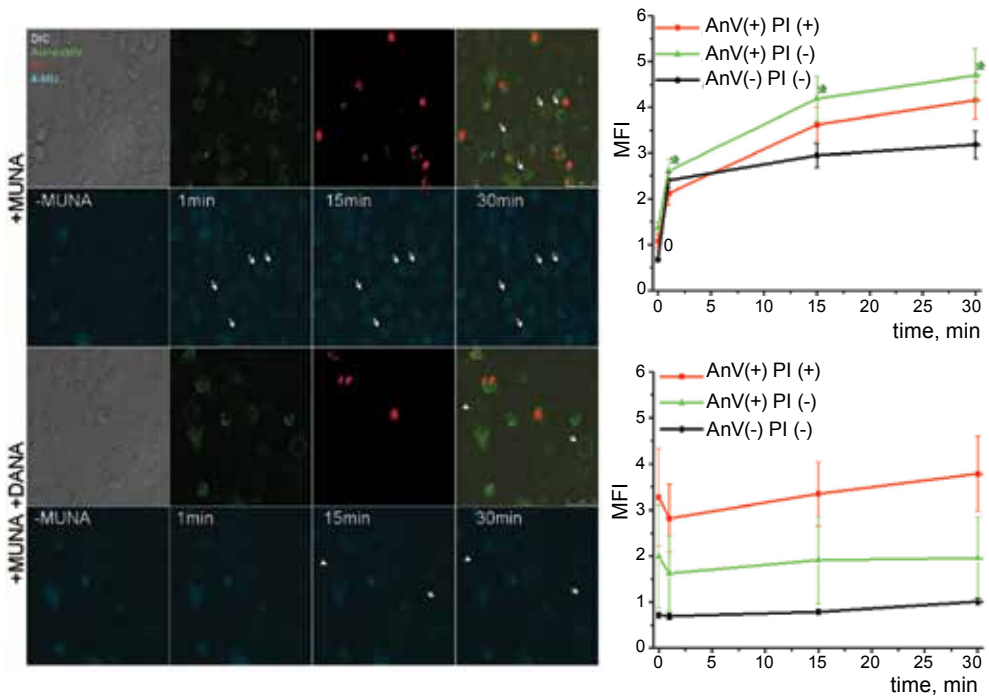


Fig. 1. Left: Accumulation of sialidase cleavage product (4-MU) in viable and dying human Jurkat T-cells, as revealed by the multi-channel confocal microscopy. Cells were counterstained with Annexin V-FITC/PI. Upper rows – cleavage of sialidase substrate 4-MUNA, lower rows – sialidase inhibitor DANA prevented the appearance of cleavage product in the apoptotic cells. Right: MFI of blue fluorescent signal produced during cleavage of sialidase substrate 4-MU-NA in viable, apoptotic and necrotic cells, without (left) and with (right) addition of sialidase inhibitor. Apoptotic cells possessed an increased sialidase activity on their surface. Densitometry of confocal fluorescent images

background staining (Fig. 1). Analysis of MFI of 3 groups of cells, AnV(-)/PI(-), AnV(+)/PI(-) and AnV(+)/PI(+), revealed that cleaved sialidase substrate was accumulated during the course of incubation in all cell groups, however, with different rate (Fig. 1). Sialidase activity in the apoptotic (AnV(+)/PI(-)) cells was significantly higher than in viable cells (AnV(-)/PI(-)). Cell incubation with both sialidase substrate and sialidase inhibitor DANA (2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid) prevented an appearance of blue fluorescent signal in both the apoptotic and viable cells. We speculate that blue fluorescent signal observed in opened (PI-positive) cells, results from leakage of fluorescent intracellular compounds, probably of cytochromes, with similar fluorescence spectra. That was due to blue laser (405 nm) used in our and other commercially available confo-

cal systems, since sialidase activity was not detected in primary necrotic cells (heated to 100 °C for 60 s) when using fluorometric approach with excitation at 365 nm. Besides, separation of PM fraction and its further separation into intra-membrane and peripheral proteins allowed localizing sialidase activity in the integral fraction of apoptotic PM.

Thus, both fluorescent and confocal microscopy allowed demonstrating that MUNA cleavage can be applied for detection of sialidase on cell surface. By using current approach, we proved an increase of sialidase activity on apoptotic (AnV+/PI-) but not necrotic (AnV+/PI+) or viable Jurkat T-cells.

Elevated sialidase activity in PM at apoptosis can explain an exposure of galactose residues on the surface of dying cell. At first, we supposed that the next set of enzymes, like galactosidases and N-acetylglucosaminidase further trip typical N-glycans of cell surface to expose oligomannose-rich residues. However, soon we found that we were wrong, since testing of galactosidase activity with 4-MU-Gal (2'-(4-methylumbelliferyl)- β -D-galactoside) failed to detect any significant activity on both cell surface and in the conditioned media. On the contrary, an increased sialidase activity was detected on cell surface that rebutted the above noted hypothesis of sequential action of sialidases and galactosidases (Fig. 2). Thus, the origin of oligomannose residues on cell surface at apoptosis remained to be determined.

Glycosylation patterns of two types of apoptotic blebs

Oligomannose residues in the form of N-glycan precursor are synthesized in ER of eukaryotic cell, then they are glucosylated (glucosylation serves as a retention signal for ER via binding with calnexin and calreticulin), transferred to the synthesized protein, deglycosylated, and finally, protein bearing N-glycan with oligomannose residues is transferred to Golgi apparatus [46–50]. In 2007, Herrmann and collaborators reported about a possibility of exposure of ER resident proteins (calnexin, the KDEL receptor and a dysfunctional immunoglobulin heavy chain) and ER-associated ganglioside GM1 on the surface of shrunken apoptotic cell. These investigators suggested that during apoptosis, ER membrane is transported to cell surface in order to substitute PM that has been lost during membrane blebbing process (decreased surface/volume ratio) [51]. A possibility for ER components to bypass the Golgi complex during their transportation to PM was reported [52, 53], however, there is no information on whether ER-derived oligomannose-residues can be transferred directly to PM and on the course of this process at apoptosis.

We have started a joint project in collaboration with Prof. Herrmann's group aimed at elucidation of the ways of formation of the apoptotic blebs

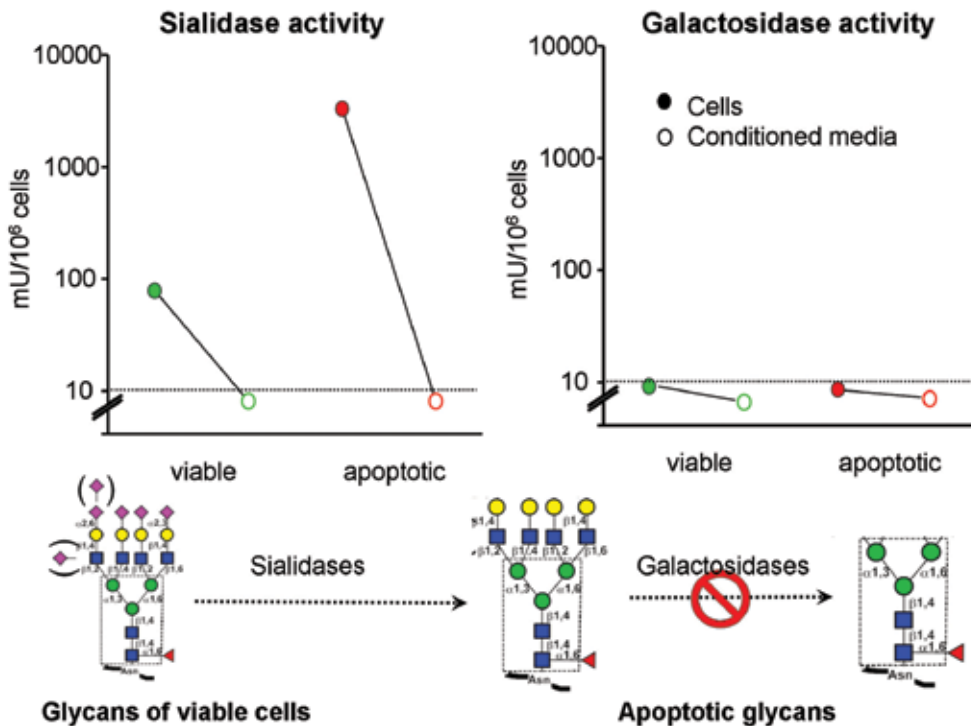


Fig. 2. Sialidases on surface of apoptotic cell (not secreted to intracellular medium) contribute to desialylation of dying cells and appearance of galactose residues, while galactosidase activity was not detected neither on surface of apoptotic cell, nor in cell incubation medium

(here and after referred as ACMV - Apoptotic sub-Cellular Micro-Vesicles) at apoptosis, their glycol-content and immunological properties. We labeled cells' ER with ER-tracker (Invitrogen), induced apoptosis, and followed the carbohydrate content of the formed blebs, as well as their sialidase activity that was measured by the technique described above [43]. We have observed sialidase activity on both shrunken cell surface and PM-derived ACMV (negative for ER-tracker signal) (Fig. 3A), and similar staining pattern was observed for VAA lectin specific to terminal galactose residues (Fig. 3B). Thus, PM components which were not bearing ER tags, possessed sialidase activity and exposed desialylated (galactose-rich) glycoepitops. To the contrary, the ACMV arising from ER (positive for ER-tracker) were also positively stained with NPL lectin (Fig. 3C) specific to oligomannose N-glycans and with CEL lectin (Fig. 3D) specific to glucosylated oligomannose N-glycans (present only in ER). Based on this and

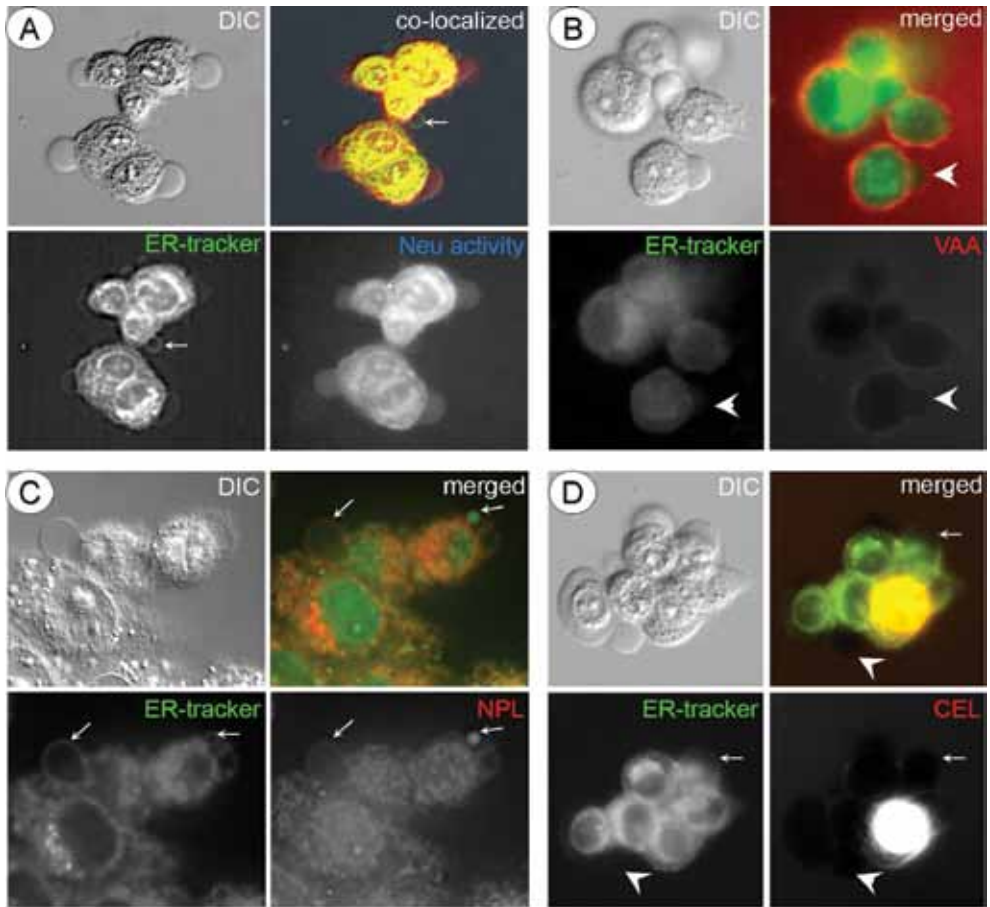


Fig. 3. Co-localization of ER-derived blebs with sialidase activity (negative, in **A**), VAA lectin staining (negative, in **B**), NPL lectin staining (positive, in **C**) and CEL lectin staining (positive in **D**)

other data described in more detail in our paper [39], we have concluded that apoptotic cells produce two distinct types of ACMV: 1) those derived from PM and possessing sialidase activity and desialylated, galactose-rich glycoepitops, and 2) those arising from ER and bearing oligomannose residues, residual components and glycolipids of ER-membranes, but lacking sialidase activity. These pathways are summarized in Fig. 4.

In our studies devoted to altered surface glycoprofile at apoptosis, we used apoptosis inducers of different nature: chemical (cisplatin, doxorubicin, etoposide, methotrexate, dexamethasone, etc.), physical (hyperthermia, X-radiation), and biological (anti-CD95-Ab, galectin-3). Both *in vitro* (a list of murine and human cell lines) and *in vivo* (human lymphocytes,

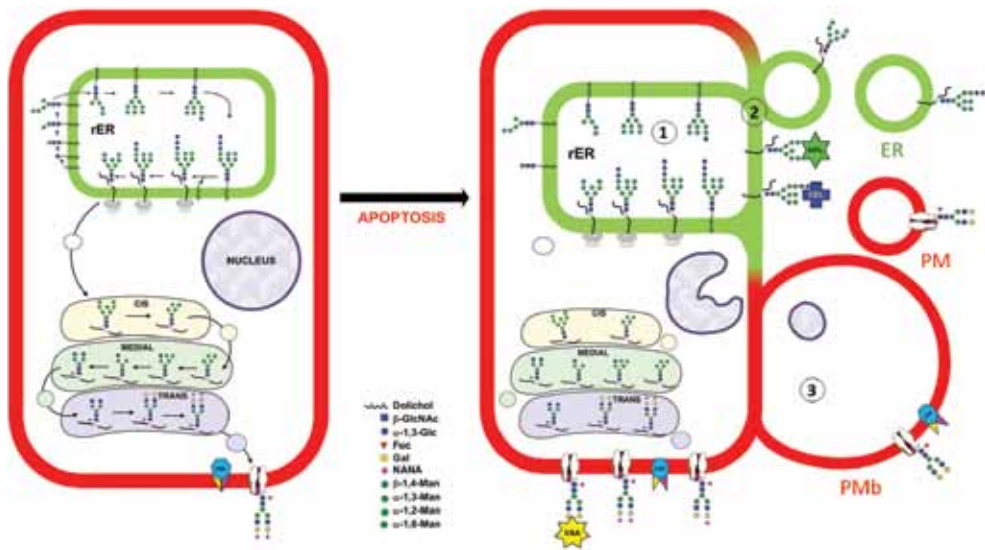


Fig. 4. The dual pathway model of altered N-glycan exposure during late apoptosis and formation of 2 distinct types of membrane blebs. (1) Conventional *de novo* glycan synthesis is not active during apoptosis. (2) ER membranes with immature glycans are exposed on cell surface and in the ER-derived blebs. (3) Apoptosis is accompanied by (caspase dependent, see later) activation of surface sialidases leading to desialylation of preexisting glycoepitopes on cell surface and PM-derived blebs which also can bear fragments of cell nucleus

PMN cells, mouse splenocytes, murine L1210 leucocytes inoculated to mouse) grown cells were studied (26,30). Changes in cell PM glycoepitops were detected with peroxidase-labeled specific lectins with subsequent cytochemical analysis and of FITC-labeled lectins followed by flow cytometry. They were observed as early as 9-12 hrs after apoptosis induction (26), coinciding with the data of other investigators (25), and indicating that change of glycoepitops is an early feature of apoptotic cells.

Other data were obtained demonstrating that caspase cascade was the first common denominator in a series of molecular targets activated at apoptosis induction. We have analyzed *in silico* a sequence of 4 known human sialidases for their homology, presence of caspase cleavage sites, and availability of trans-membrane domains (Fig. 5A). The site of cleavage by caspase 3 was found to be present in human Neu1 with very high probability, as well as the trans-membrane domain. Then we screened the lysates of intact, caspase-3 treated and aged human PMN cells for the expression of all known sialidases (Neu1-Neu4) by the Western-blot analysis (Fig. 5B). Human PMN cells served as a perfect experimental model, since

We also showed [39] that pan-caspase and specific caspase inhibitors (towards caspases 3, 7, 8) blocked the sialidase activity observed in lysates and cell suspensions of the apoptotic human PMN cells. An increase in sialidase activity was blocked by immunoprecipitation with anti-Neu1 antibodies, and in MCF-7 cell line lacking caspase-3 expression. However, knock-in of MCF-7 cells with caspase-3 gene resulted in the increase of sialidase activity at apoptosis [39]. These and other data presented in [39] allowed us to suggest a specific molecular mechanism leading to caspase-3 dependent cleavage, membrane translocation and exposure of cell surface sialidase activity at apoptosis (Fig. 5C).

Altered glycoepitops at cell clearance and autoimmune disorders

Inappropriate clearance of dying cells and their remnants (apoptotic blebs and apoptotic bodies) lead to accumulation of dying cells remnants modified by the oxidative process, and, thus, immunologically “foreign” for the organism [54]. Cells eventually lose their integrity and release modified apoptotic cell content to milieu that provokes immune response [55–57]. Chronic failure of apoptotic cell clearance is now widely accepted to be a primary cause which initiates systemic autoimmunity in diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) [58, 59].

There are two distinct types of ACMV produced at apoptosis [39]: a) those derived from plasma membrane (PM), and characterized by increased sialidase activity, desialylated glycoprofile, exposing PS and being usually quite big (from 1 to up to 25 μm), produced in a range of one to few per cell, and b) those derived from endoplasmic reticulum (ER), possessing immature oligomannose-rich glycans typical to ER, usually being produced much smaller in size ($\sim 2\text{--}5 \mu\text{m}$) but in higher numbers, and reportedly exposing other ER components, such as calnexin, KDEL receptor [51], and calreticulin [60]. The latter type of blebs is preferentially engulfed by human macrophages, as shown by us [39], and the speed of phagocytosis was found to be independent on blebs’ size, but dependent on their surface composition.

It is generally accepted that sialylation level is a basic mechanism regulating RBC clearance in the liver by Kupfer cells. However, it remains unknown whether this is also true for the apoptotic cells and can be used to facilitate their removal from the body. We analyzed whether desialylation influenced a process of apoptotic cell engulfment. To reach this aim, neuraminidase treated apoptotic cells and cell-derived membrane blebs were co-incubated with monocyte-derived phagocytes (both human blood derived and differentiated from monocyte progenitor cell line THP-1). Neuraminidase treated apoptotic cells and apoptotic blebs were washed before co-incubation (in the presence of heat inactivated fetal bovine se-

rum) in order to remove residual neuraminidase. An engulfment of apoptotic cells and apoptotic cell-derived membrane blebs was quantified by flow cytometry. As shown in Fig. 6A, the engulfment of apoptotic cells was enhanced after neuraminidase treatment when compared to untreated cells. That effect was statistically significant if neuraminidase treatment was performed for 30 min. At the same time, treatment of cells with sialidase inhibitor (DANA) abrogated the effect. Similar effect was observed at analyzing the engulfment of neuraminidase treated apoptotic cell-derived membrane blebs, as described by us [61]. To discriminate between binding of apoptotic cells and actual engulfment, we performed confocal microscopy, as shown in Fig. 6B. Here, almost every prey pre-treated with the neuraminidase was engulfed by phagocytes after co-incubation period.

Various constituents of the glycocalyx are recognised by a group of sugar binding proteins called the lectins [5]. Human lectins are divided into different groups depending on their structural diversities. C-Type-lectins (e.g. Mannose binding lectin, pulmonary surfactant, Macrophage mannose receptor, DC-SIGN) bind their ligands in a calcium-dependent manner. Galectins are specific for β -galactosides. I-type-lectins, which belong to the family of immunoglobulins, include the sialic acid specific group of siglecs [62]. These lectins are amongst others involved in pathogen recognition, complement activation, immunomodulation, cell adhesion, and migration [63]. CD43 and the asialoglycoprotein receptor were also involved in glycan recognition and phagocytosis [25]. Many other molecules involved in the recognition of “eat-me” signals on apoptotic cells, of both lipid, carbohydrate, protein and other nature, are perfectly described in recent paper published by Wei Li [26] (Fig. 7A).

To estimate whether there is a cooperativity between PS, oligomannose- and desialylated (galactose-rich) glycoepitops on dying cells in the ensuring their phagocytosis by macrophages (efferocytosis – phagocytosis of apoptotic cells), we used human monocytosis model which was described previously [39, 61]. Here, human venous blood-derived monocytes were differentiated into macrophages and syngenic (from the same donor) PMN cells aged for 24 hours served as an apoptotic prey. Prey cells were co-incubated with phagocytes (in 5 : 1 ration) for 2 hours, and the amount of uneaten cells was calculated. At the first stage, we tested a set of mannose-based derivatives and found that among many synthetic and natural compounds, heptyl- α -D-mannoside possessed the most profound effect on the efferocytosis. That compound was synthesized by our colleagues Dr. S. Gouin and J. Bouckaert [64], and kindly provided for our experiments. Preliminary screening showed that galactose residues were perfectly blocked by galactose-specific human galectin 3 which was kindly provided by prof. H.-J. Gabius who is considered to be a “godfather” of the

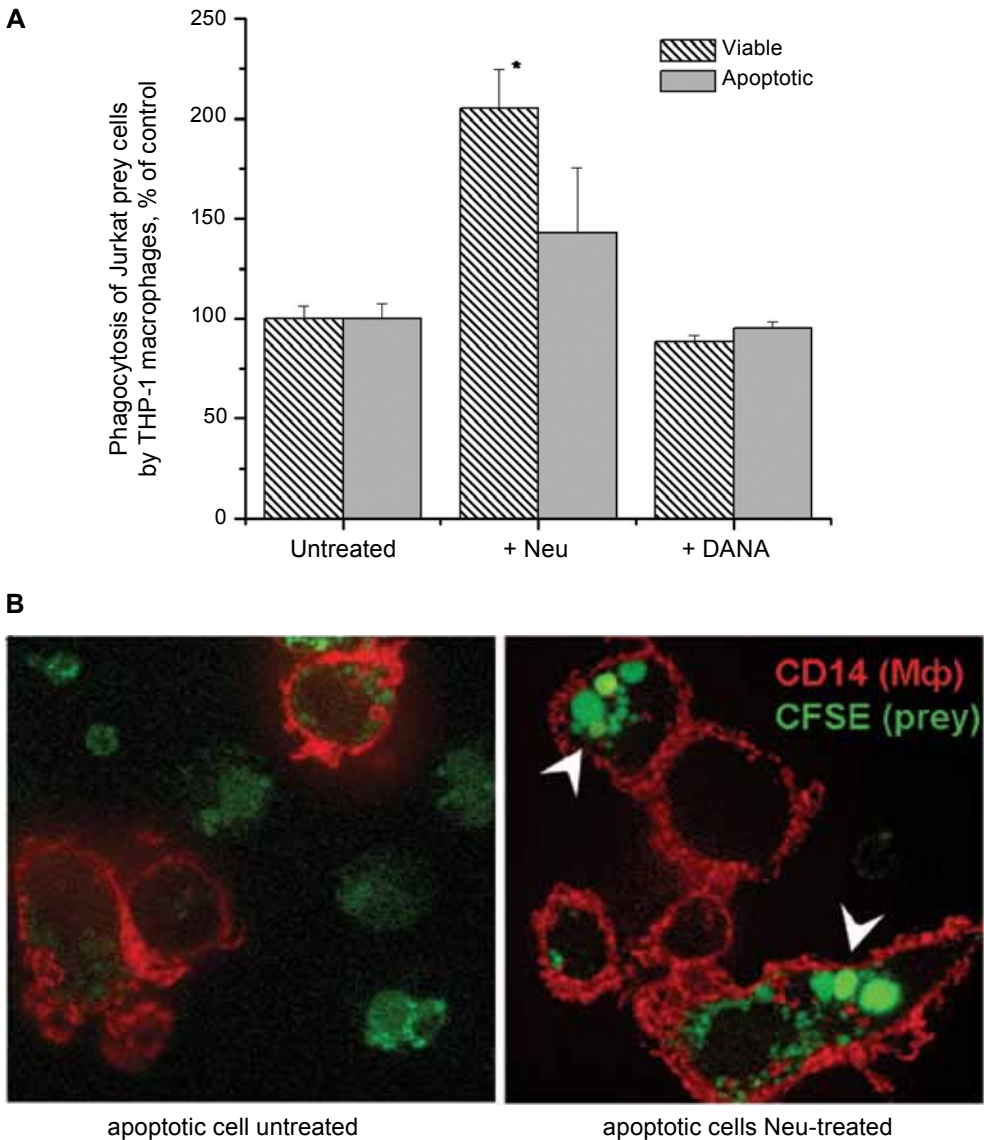


Fig. 6. Neuraminidase-treatment enhances uptake of apoptotic cells. A – THP-1 monocyte-derived phagocytes were co-incubated with CFSE-labelled apoptotic Jurkat T-cells. Numbers of phagocytes (CD14+) possessing CFSE signal (those, engulfed the preys) and normalized to controls are shown. The graphs show mean values \pm SD of 3 independent experiments. B – Confocal microscopy of anti-CD14 stained phagocytes (red) and CFSE stained apoptotic cells (green) is shown. Left: untreated lymphoblasts; right: lymphoblasts after neuraminidase treatment for 30 min. White arrow tips indicate the engulfed apoptotic cells. Reprinted with permission from [61]

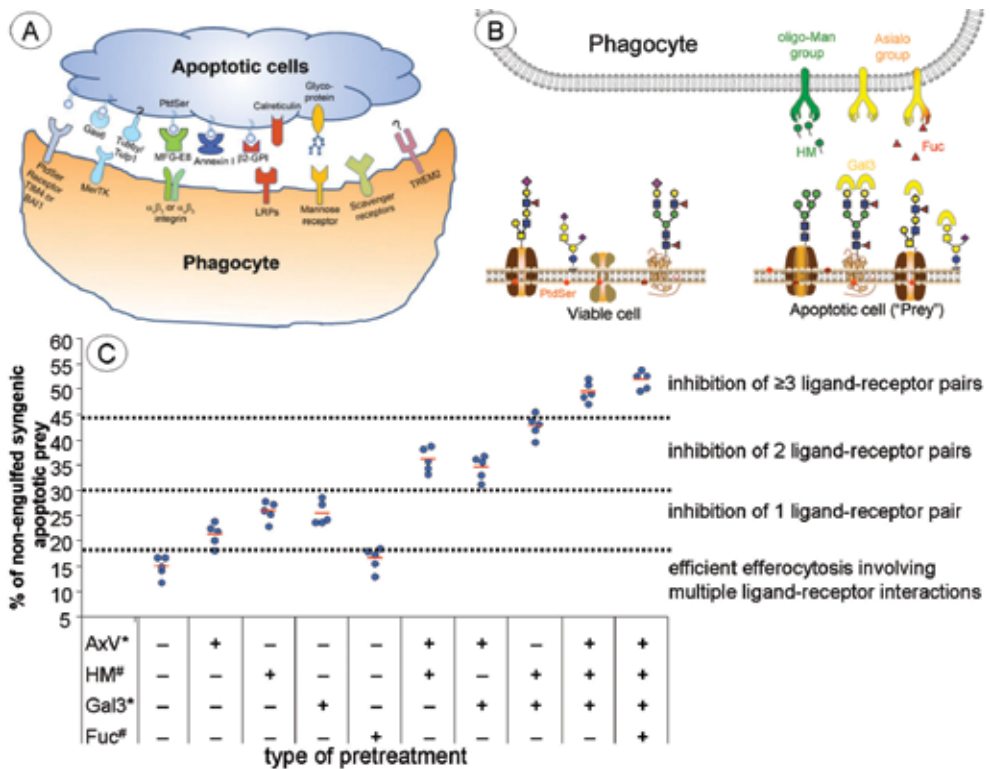


Fig. 7. **A** – Eat-me signals and phagocytic receptors for the engulfment of apoptotic cells. The apoptotic cells display various eat-me signals, which bind to their receptors on phagocyte surface either directly or indirectly through bridging molecules. Multiple eat-me signals and their receptors can form a cluster within the phagocytic cup as the engulfment synapse to facilitate the clearance of apoptotic cells. Eat-me signals and their cognate receptors are shown in the same color. Reprinted with a permission from [26]. **B** – Schematic representation of changes of glycoepitops on apoptotic cells and inhibition of potential glycans-receptor pairs involved in cell clearance. **C** – Engulfment of apoptotic prey involves interaction of three and more ligand-receptor pairs, with oligomannose and desialylated glycans being recognized by distinct mechanisms. Data on inhibition of efferocytosis using the indicated inhibitor pairs.

*- pretreatment of prey, # - pretreatment of Mφ; AxV – annexin V, 200 μg/ml; HM – heptyl α-D-mannoside 10 nM ; Gal3 – human Galectin3, 100 μg/ml; Fuc – fucose, 200 μg/ml

galectin science [65]. PS interaction were inhibited with annexin V [25]. Taking into account a suggestion described in [26], that desialylation might expose sub-terminal fucose residue which is being quite rare and can serve as a binding target for phagocytosis receptors, fucose was also included in the list of tested inhibitors. Schematically, the types of inhibition tested in the experiment are shown in Fig. 7B. The obtained data suggest that the engulfment of the apoptotic prey involves an interaction of three and more ligand-receptor pairs with oligomannose and desialylated glycans which are recognized by distinct mechanisms, as well as PS, and cooperation of all these three “eat-me” molecules is needed for normal efferocytosis. Since, even with using a combination of four inhibitors we were able to block efferocytosis by only 50-55%, the involvement of other ligand-receptor pairs in the process should be assumed.

Contribution of ACMV in development of auto-antibodies. It is known that clearance-related diseases, like SLE, are accompanied by the presence of anti-DNA and anti-nuclear auto-antibodies, being a typical feature in 85-95% of cases [66], the etiology of these antibodies is unclear. When we first demonstrated that some nuclear components, like histone H2B, but not components of nuclear membrane [39], were exposed in ACMV, and taking into account that: a) ACMV are fragile and are more likely to release their content to milieu, and b) insufficient clearance results in a chronic inflammation [58] and production of auto-antibodies against self proteins, we searched for nuclear components in ACMV.

We used human HeLa cells stably expressing histone H2B-GFP, and induced their apoptosis with UV-B irradiation. We applied differential interference contrast (DIC) to visualize apoptotic blebs and observed that after 4 to 6 hours, cells started to produce a blebbing pattern typical to this and many other cell types: up to few dozens per cell of relatively small (0.5-5 μm) ACMV and lately one or rarely two big ACMV which we designated as a “terminal bleb”. Interestingly, some of the terminal blebs possessed nuclear material visualized as fluorescent histone H2B signal by using fluorescent microscopy, nuclear material being enclosed by plasma membrane visualized by DiIC₁₈(3) (Invitrogen) staining (Fig. 8A). We also performed counterstaining of the apoptotic HeLa cells expressing histone H2B-GFP with DAPI, and demonstrated that the prevailing majority of terminal blebs possessing histone H2B were positive for DNA revealed by DAPI (Fig. 8B). Thus, some of the apoptotic ACMV, namely big terminal blebs, can contain nuclear material, namely DNA and histones of dying cells. Due to big size, these terminal blebs are most labile among the apoptotic remnants, they are derived from plasma membrane, as we have shown earlier the clearance of PM-derived blebs by the macrophages is relatively slow in comparison to ACMV derived from ER [39]. Due to high fragility,

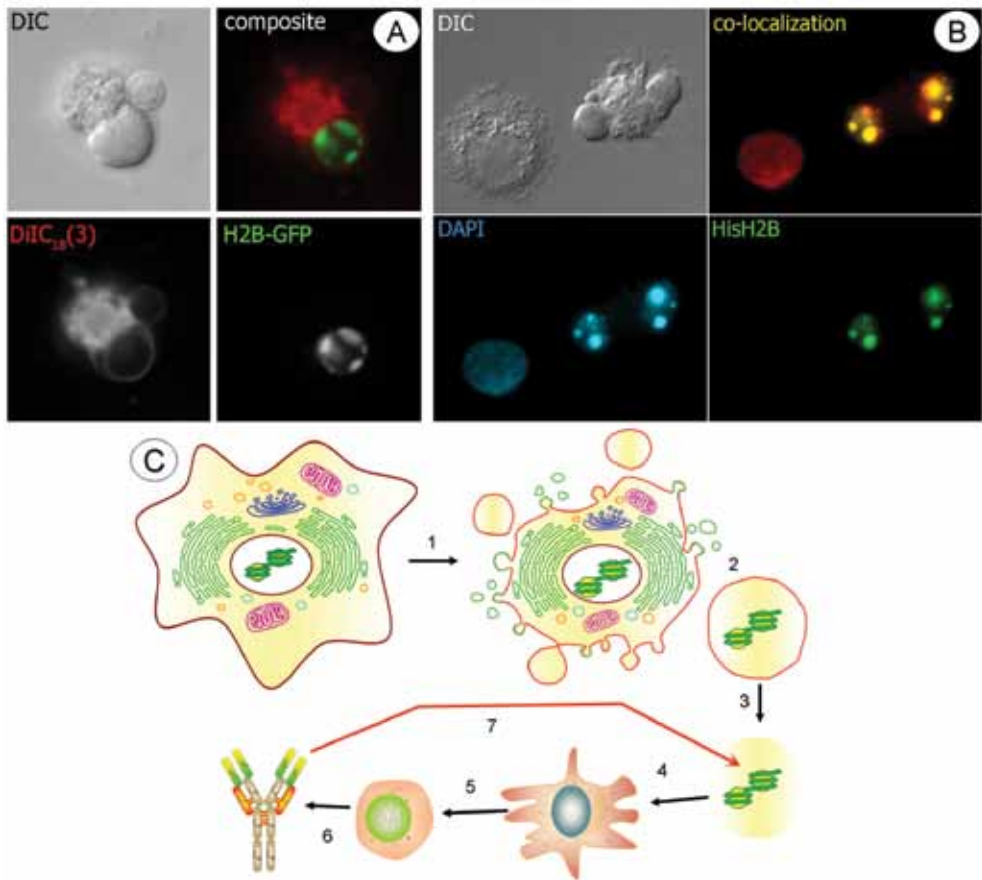


Fig. 8. A – Apoptotic (UV-B irradiated) HeLa cells produce big plasma membrane-derived (“terminal”) ACMV which can contain nuclear material, visualized by histone H2B-GFP signal. The plasma membrane was pre-stained the lipophilic dye DiIC₁₈(3). B – Terminal apoptotic ACMV can contain nuclear material as DNA (DAPI staining) and histones (histone H2B-GFP signal). In a co-localization image, the DAPI signal is pseudo-colored in red for better visualization. C – Hypothetical scheme describing how the apoptotic events might lead to anti-nuclear auto-Ab production. During apoptosis (1) the cell exposes different types of the ACMV with terminal ACMV (2) possessing nuclear material. Inappropriate efferocytosis of these ACMV (3) leads to the leakage of their contents (3) into the extracellular milieu and their presentation to immune cells (4) results in immune response (5) and production of anti-nuclear auto-Ab (6). These antibodies then bind nuclear debris (7)

these terminal blebs have high chance to be damaged and leak internal content, DNA and histone, into cellular milieu in case of an inappropriate clearance or accidental damage.

Taking into account these data, we suggested that selective exposure of nuclear material in a big and fragile apoptotic ACMV can be a way of exposure of nuclear material into milieu, as well as a reason to cause a development of antibodies against the nuclear components (Fig. 8C). Recently, it was shown by Shiller et al. [67] that High mobility group box protein B1 (HMGB1), a nuclear protein reportedly involved in structural organization of DNA and usually released from the necrotic cells or upon cellular activation, is translocated into the ACMV at apoptosis, also in paper in press, further supporting a proposed hypothesis.

Thus, carbohydrate recognition systems play a crucial role in detecting the apoptotic cells, as well as their clearance from the organism.

Acknowledgements

The authors wish to thank those who contributed greatly in different stages of this work, particularly Tanya Dumych (Shkandina), Andriy Tomin, Iryna Mahorivska, Christina Janko, Luis E. Muñoz, Iryna Kril, Yaroslav Tolstiak, Valentyna Chop'yak, Matthias Zirngibl, Barbara G. Fűrnrrohr, Martin Schiller, Petra Heyder, Marijo Parcina, Georg Schett, Maxim Lootsik, Hans-Joahhim Gabius. We are especially grateful to Martin Herrmann, Volodymyr Antonyuk, and Yuriy Ya. Kit.

References

1. Lawen A. Apoptosis - an introduction // *BioEssays*. – 2003. – **25**. – P. 888–896.
2. Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages // *J. Immunol.* – 1992. – **148**. – P. 2207–2216.
3. Hochreiter-Hufford A., Ravichandran K. S. Clearing the Dead: Apoptotic Cell Sensing, Recognition, Engulfment, and Digestion // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – **5**.
4. Gabius H. J., Siebert H. C., Andre S. et al. Chemical biology of the sugar code // *ChemBiochem.* – 2004. – **5**. – P. 740–764.
5. Sharon N., Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules // *Glycobiology*. – 2004. – **14**. – P. 53R–562.
6. Antonyuk V. O. The lectins and their resources [in Ukrainian]. – Lviv: Quart, 2005.
7. Pittoni V., Valesini G. The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity // *Autoimmun. Rev.* – 2002. – **1**. – P. 154–161.

8. *Geijtenbeek T. B., van Vliet S. J., Engering A. et al.* Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – **22**. – P. 33–54.
9. *Cline A. M., Radic M. Z.* Apoptosis, subcellular particles, and autoimmunity // *Clin. Immunol.* – 2004. – **112**. – P. 175–182.
10. *Henson P. M., Bratton D. L., Fadok V. A.* Apoptotic cell removal // *Curr. Biol.* – 2001. – **11**. – P. R795–R805.
11. *Fujita T., Matsushita M., Endo Y.* The lectin-complement pathway its role in innate immunity and evolution // *Immunol. Rev.* – 2004. – **198**. – P. 185–202.
12. *Bilyy R., Stoika R.* Search for novel cell surface markers of apoptotic cells // *Autoimmunity.* – 2007. – **40**. – P. 249–253.
13. *Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // *Br. J. Cancer.* – 1972. – **26**. – P. 239–257.
14. *Duvall E., Wyllie A. H., Morris R. G.* Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis) // *Immunology.* – 1985. – **56**. – P. 351–358.
15. *Morris R. G., Hargreaves A. D., Duvall E., Wyllie A. H.* Hormone-induced cell death. 2. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis // *Am. J. Pathol.* – 1984. – **115**. – P. 426–436.
16. *Dini L., Autuori F., Lentini A. et al.* The clearance of apoptotic cells in the liver is mediated by the asialoglycoprotein receptor // *FEBS Lett.* – 1992. – **296**. – P. 174–178.
17. *Hall S. E., Savill J. S., Henson P. M., Haslett C.* Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin // *J. Immunol.* – 1994. – **153**. – P. 3218–227.
18. *Dini L., Lentini A., Diez G. D. et al.* Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells // *J. Cell Sci.* – 1995. – **108**, Pt 3. – P. 967–973.
19. *Falasca L., Bergamini A., Serafino A. et al.* Human Kupffer cell recognition and phagocytosis of apoptotic peripheral blood lymphocytes // *Exp. Cell Res.* – 1996. – **224**. – P. 152–162.
20. *Verhoven B., Krahling S., Schlegel R. A., Williamson P.* Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes // *Cell Death. Differ.* – 1999. – **6**. – P. 262–270.
21. *Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P.* Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes // *J. Exp. Med.* – 1995. – **182**. – P. 1597–1601.
22. *Krahling S., Callahan M. K., Williamson P., Schlegel R. A.* Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages // *Cell Death. Differ.* – 1999. – **6**. – P. 183–189.
23. *Reutelingsperger C. P., Christiaan Peter M (inventors).* Method for detecting and/or optionally quantifying and/or separating apoptotic cells in or from a sample. United States patent 5,834,196.

24. *van den Eijnde S. M., Luijsterburg A. J., Boshart L. et al.* In situ detection of apoptosis during embryogenesis with annexin V: from whole mount to ultrastructure // *Cytometry*. – 1997. – **29**. – P. 313–320.
25. *Chaurio R. A., Janko C., Munoz L. E. et al.* Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation // *Molecules*. – 2009. – **14**. – P. 4892–4914.
26. *Li W.* Eat-me signals: Keys to molecular phagocyte biology and “Appetite” control // *J. Cell. Physiol.* – 2012. – **227**. – P. 1291–1297.
27. *Frey B., Munoz L. E., Pausch F. et al.* The immune reaction against allogeneic necrotic cells is reduced in Annexin A5 knock out mice whose macrophages display an anti-inflammatory phenotype // *J. Cell Mol. Med.* – 2008.
28. *Munoz L. E., Frey B., Pausch F. et al.* The role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – **14**. – P. 271–277.
29. *Rapoport E., Pendu J. L.* Glycosylation alterations of cells in late phase apoptosis from colon carcinomas // *Glycobiology*. – 1999. – **9**. – P. 1337–1345.
30. *Bilyy R. O., Stoika R. S.* Lectinocytochemical detection of apoptotic murine leukemia L1210 cells // *Cytometry A*. – 2003. – **56**. – P. 89–95.
31. *Heyder P., Gaipf U. S., Beyer T. D. et al.* Early detection of apoptosis by staining of acid-treated apoptotic cells with FITC-labeled lectin from *Narcissus pseudonarcissus* // *Cytometry*. – 2003. – **55A**. – P. 86–93.
32. *Bilyy R. O., Antonyuk V. O., Stoika R. S.* Cytochemical study of role of alpha-d-mannose- and beta-d-galactose-containing glycoproteins in apoptosis // *J. Mol. Histol.* – 2004. – **35**. – P. 829–838.
33. *Azuma Y., Taniguchi A., Matsumoto K.* Decrease in cell surface sialic acid in etoposide-treated Jurkat cells and the role of cell surface sialidase // *Glycoconj. J.* – 2000. – **17**. – P. 301–306.
34. *Batisse C., Marquet J., Greffard A. et al.* Lectin-based three-color flow cytometric approach for studying cell surface glycosylation changes that occur during apoptosis // *Cytometry A*. – 2004. – **62**. – P. 81–88.
35. *Bilyy R., Tomyň A., Stoika R.* Membrane Glycoproteins During Cell Death: How And Why They Appear On The Cell Surface? // *J. Physiol. Sci.* – 2009. – **59**. – P. 155–155.
36. *Franz S., Frey B., Sheriff A. et al.* Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis // *Cytometry A*. – 2006. – **69**. – P. 230–239.
37. *Bilyy R., Kit Y., Hellman U. et al.* In vivo expression and characteristics of novel alpha-D-mannose-rich glycoprotein markers of apoptotic cells // *Cell Biol. Int.* – 2005. – **29**. – P. 920–928.
38. *Bilyy R., Kit Y., Hellman U., Stoika R.* AMID: new insights on its intracellular localization and expression at apoptosis // *Apoptosis*. – 2008. – **13**. – P. 729–732.
39. *Bilyy R. O., Shkandina T., Tomin A. et al.* Macrophages discriminate glycosylation patterns of apoptotic cell-derived microparticles // *J. Biol. Chem.* – 2012. – **287**. – P. 496–503.

40. Miyagi T. Aberrant expression of sialidase and cancer progression // Proc. Jpn. Acad. Ser. B. – 2008. – **84**. – P. 407–418.
41. Achyuthan K. E., Achyuthan A. M. Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo-alpha-sialidases (neuraminidases) // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. – 2001. – **129**. – P. 29–64.
42. Nayak D. P., Reichl U. Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus // J. Virol. Methods. – 2004. – **122**. – P. 9–15.
43. Tomin A., Shkandina T., Bilyy R. Novel assay for direct fluorescent imaging of sialidase activity // Proc. SPIE, Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II. – 2011. – **8087**. – P. 80871Z-80871Z.
44. Bilyy R., Tomin A., Stoika R. (inventors). Method of neuraminidase activity detection in cells and cellular compartments. UA Patent No. 93816 patent.
45. Shkandina T., Herrmann M., Bilyy R. Sweet kiss of dying cell: Sialidase activity on apoptotic cell is able to act toward its neighbors // Autoimmunity. – 2012. – **45**. – P. 574–578.
46. Herscovics A., Orlean P. Glycoprotein biosynthesis in yeast // FASEB J. – 1993. – **7**. – P. 540–550.
47. Kornfeld R., Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides // Annu. Rev. Biochem. – 1985. – **54**. – P. 631–664.
48. Helenius J., Aebi M. Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum // Semin. Cell Dev. Biol. – 2002. – **13**. – P. 171–178.
49. Alaimo C., Catrein I., Morf L. et al. Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides // EMBO J. – 2006. – **25**. – P. 967–976.
50. Hubbard S. C., Ivatt R. J. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides // Annu. Rev. Biochem. – 1981. – **50**. – P. 555–583.
51. Franz S., Herrmann K., Fuhrnrohr B. et al. After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes // Cell Death. Differ. – 2007. – **14**. – P. 733–742.
52. Grieve A. G., Rabouille C. Golgi Bypass: Skirting Around the Heart of Classical Secretion // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2011. – **3**. – doi: 10.1101/cshperspect.a005298.
53. Marie M., Sannerud R., Avsnes Dale H., Saraste J. Membrane traffic in the secretory pathway // Cell. Mol. Life Sci. – 2008. – **65**. – P. 2859–2874.
54. Casciola-Rosen L. A., Anhalt G., Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes // J. Exp. Med. – 1994. – **179**. – P. 1317–1330.
55. Munoz L. E., Herrmann M., Gaipal U. S. [An impaired detection and clearance of dying cells can lead to the development of chronic autoimmunity] // Z. Rheumatol. – 2005. – **64**. – P. 370–376.
56. Michlewska S., McColl A., Rossi A. G. et al. Clearance of dying cells and autoimmunity // Autoimmunity. – 2007. – **40**. – P. 267–273.

57. Schulze C., Sarter K., Herrmann M. Do we already understand all aspects connecting clearance and autoimmunity? // *Autoimmunity*. – 2007. – **40**. – P. 239–243.
58. Munoz L. E., Lauber K., Schiller M. et al. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2010. – **6**. – P. 280–289.
59. Gaipf U. S., Munoz L. E., Grossmayer G. et al. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE) // *J. Autoimmun.* – 2007. – **28**. – P. 114–121.
60. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death // *Nat. Med.* – 2007. – **13**. – P. 54–61.
61. Meesmann H. M., Fehr E-M., Kierschke S. et al. Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes // *J. Cell Sci.* – 2010. – **123**. – P. 3347–3356.
62. Kottgen E., Reutter W., Tauber R. [Human lectins and their correspondent glycans in cell biology and clinical medicine] // *Med. Klin.(Munich)*. – 2003. – **98**. – P. 717–738.
63. Crocker P. R., Paulson J. C., Varki A. Siglecs and their roles in the immune system // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – **7**. – P. 255–266.
64. Gouin S. G., Wellens A., Bouckaert J., Kovensky J. Synthetic multimeric heptyl mannosides as potent antiadhesives of uropathogenic *Escherichia coli* // *Chem. Med. Chem.* – 2009. – **4**. – P. 749–755.
65. Beer A., Andre S., Kaltner H. et al. Human galectins as sensors for apoptosis/necrosis-associated surface changes of granulocytes and lymphocytes // *Cytometry A*. – 2008. – **73**. – P. 139–147.
66. Pavlovic M., Kats A., Cavallo M. et al. Pathogenic and Epiphenomenal Anti-DNA Antibodies in SLE // *Autoimmune Diseases*. – 2010. – **2010**.
67. Schiller M., Heyder P., Ziegler S. et al. During apoptosis HMGB1 is translocated into apoptotic cell-derived membrane vesicles // *Autoimmunity*. – 2013. – **46**. – P. 342–346.

**THE GMP-BASED DRUG SUBSTANCE SCTL DEVELOPMENT
AIMING AT PREVENTION OF OPPORTUNISTIC INFECTIONS
AFTER X-RAY- AND CHEMOTHERAPY OF CANCER.**

**A SYNTHETIC COMBINATORIAL TETRAPEPTIDE LIBRARY
SUBSTITUTION FOR CALF THYMUS EXTRACT**

*Dr. CHRISTIAN BIRR**

*formerly Max-Planck-Institute for Medical Research,
Apl. Professor at Heidelberg University, Institute for Organic Chemistry,
Address: ORPEGEN Peptide Chemicals GmbH, Czernyring 22,
69115 Heidelberg, Germany*

SCTL is the fully synthetic correlate of an enzymatic partially hydrolyzed extract from calf thymus, HTX. To exclude completely the transmission of bovine spongiform encephalitis (BSE) by the bovine thymus product a fully synthetic correlate of the active principles in the thymus tissue hydrolysate has been developed, namely SCTL. This synthetic peptide library has meanwhile substituted calf thymus extract preparations in several cosmetics and drug products.

The active principles of SCTL have been invented by the author but the application of the drug substance in cosmetic and pharmaceutical products has been exploited by others. For SCTL only limited pharmacological and toxicological data are available. Some interesting biological activities, though, have been shown for SCTL (Birr et al., 1987, 1998, 2003) which might explain to some extent the modes of action and its clinical effectiveness.

In traditional European medicine the application of calf thymus extract preparations in geriatric and immunodeficiency diseases has been practised for more than three centuries. In several countries traditional drug preparations and cosmetics from HTX have been used successfully. There are field reports on prevention of alopecia, opportunistic infections and cancer. Several publications report about the product efficacy in the reduction of hair loss secondary to cytostatic chemotherapy.

But the mode of action of HTX, the partially hydrolyzed extract from calf thymus, is not known. Since biological effects on the proliferation of human lymphocytes have been shown, actions similar to other thymus proteins are assumed. Precise descriptions of the mode of action are hampered

* With appreciation dedicated to Professor Serhiy V. Komisarenko, Palladin Institute of Biochemistry, Kyiv, Ukraine, on the occasion of his 70th birthday, July 9, 2013.

by the fact that drug products from HTX are by no means consistent in preparation and composition.

In the effort to completely prevent the transmission of BSE by this kind of product a fully synthetic peptide library SCTL was developed which resembles the major components of HTX in its chemical composition. SCTL contains di-, tri-, tetrapeptides and free amino acids, all in number and quantity specific for calf thymus partial hydrolysates. The preparative consistency and chemical composition of this well-defined synthetic drug product will be described in more detail in the next section of this article.

Chemistry of SCTL

The European bovine & transmissible spongiformic encephalitis (BSE/TSE) catastrophe of the recent decades has put this entire field of natural bovine extract therapeutics into crisis. Many thymus preparations have become banned by law. Since then, a very well established clientele among the elderly, but also patients, therapists, pharmacies and industries were looking for safe alternatives for many of these well established bovine tissue extract drug products.

One of these products was HTX from bovine starting material. The risk of BSE/TSE transmission could not be fully excluded. Even if the traditional manufacturing process was carried out thoroughly, due to the complex composition (amino acids, peptides, saccharides, fats etc.) and the naturally occurring variability in the primary tissue source, an undesirable inconsistency in the product properties was observed. Due to the lack of a specific chemical marker, it was not possible to compensate this by standardising the product at the end of the manufacturing process. Owing to the manufacturing process varying by-products from thymus tissue, which were considered to be impurities remained in the finished. It was not possible to separate these from the target fraction of the enzymatic hydrolysate.

A major research and development project was launched at the author's laboratory by an industry sponsor to find a composition which has similar pharmacological properties and is comparable to the main fraction of the partial enzymatic hydrolysate HTX. In order to achieve the closest synthetic version, analytical investigations were carried out with emphasis on the peptide composition of this natural tissue extract. The aim of these studies was the development of a fully synthetic chemically standardized product resembling as close as possible the chemical composition and the immunopharmacological properties of HTX.

The main fraction of HTX has an 80% protein content and a molecular weight range of up to 10 kDa. It was determined that one third of the natural material contains free amino acids together with short oligopep-

tides, which by pool sequence analysis were determined to consist mainly of tetrapeptides accompanied by traces of di- and tripeptides. Furthermore, there were some other natural compounds like hexoses, saccharides, sialic and nucleic acids, also modifications of the peptide compositions were detected.

Based on these results it was considered to synthesize a statistic combinatorial peptide library composed out of di-, tri- and tetrapeptides and a pool of free amino acids, in number and molar proportional quantity similar to the amino acid composition of the main fraction of HTX, without adding any further ingredient. Following this way SCTL has been developed as a synthetic version of the peptide content in natural thymus partial hydrolysate, conceptually differing from the development of molecularly defined thymic polypeptides (Birr et.al., 1979, 1983, 1984).

Analytical Investigations

Due to the inconsistency in the composition of HTX several batches of the natural product were analysed for obtaining reliable mean values.

The sequencing of the terminal amino acids of the main fraction of HTX resulted in a termination after three cycles, leading to the conclusion that the natural hydrolysate consists mainly of free amino acids as well as di-, tri and tetrapeptides. The sequencing also showed that these peptides consist of a statistical distribution of homologues which could not be further separated for component identification.

The analytical data show that HTX consists of approximately 32.5% free amino acids, the remaining are di-, tri and tetrapeptides. The peptides consist mainly of Asp, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Leu, Lys and Arg, whereas the absence of Cys in the peptides may result from oxidative destruction during analysis .

The lipid amount was about 8% and the amount of nucleic acids less than 0.1%.

The amount of other compounds found were 8% hexoses, up to 1.5% sialic acid and about 5% mono saccharides. These compounds of HTX were considered as carrier agents or impurities and consequently not included in the peptide synthesis concept for the generation of SCTL.

Analytical comparison of the natural HTX with synthetic SCTL by amino acids analysis and RP-HPLC

A comparison of free and total amino acids is given in Table 1 to Table 3.

The HPLC analysis of synthetic SCTL and the main fraction of the partial hydrolysate of calf thymus HTX show a similar profile as demonstrated in Fig. 1 and Fig. 2.

Table 1. Free amino acids determination in HTX and in SCTL for comparison

Batch	8863 (1)	8863 (2)	968	T.E.P.	Mean HTX	Theor. SCTL
Amino acid	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]
Asp	2.09	2.15	2.23	3.21	2.42	2.40
Thr	5.70	5.69	4.48	4.67	5.13	9.24 ^{a)}
Ser	3.84	3.82	5.48	4.53	4.42	8.60 ^{a)}
Glu	8.60	8.32	9.78	8.39	8.77	6.47
Pro	3.10	3.11	2.33	3.06	2.90	2.29
Gly	2.77	2.60	2.94	2.98	2.82	4.93
Ala	8.57	8.43	7.88	8.42	8.32	11.67
Cys	—	—	—	—	—	0.61
Val	5.63	5.69	6.30	8.00	6.40	6.74
Met	2.46	2.52	3.23	5.38	3.40	3.23
Ile	4.62	4.41	5.57	5.93	5.13	4.24
Leu	14.74	14.91	14.45	15.87	14.99	14.12
Tyr	4.89	4.41	5.34	1.30	3.99	0.36
Phe	5.56	5.83	5.71	6.36	5.87	4.26
Trp	—	—	—	—	—	0.00
His	1.32	1.30	—	—	0.65	1.22
Lys	12.78	13.24	12.61	11.00	12.41	10.35
Arg	13.32	13.58	11.67	10.91	12.37	9.27
Total	100	100	100	100	100	100

Here and in Tables 2–3: a) Destroyed by analysis conditions; b) Only 10 % value specified; c) Surplus for compensation of 0.5% collagen (Pro, Gly, Ala) in total composition; d) Surplus for thermal destruction compensation in total composition

From these findings it was decided to synthesize a statistic combinatorial peptide library consisting mainly of tetrapeptides and amino acids together with amounts of up to 10% di- and tripeptides each. The pool of amino acids was standardized with regard for the unprotected amino acids in each reaction step.

Studies for determination of the biological activity by mitogen costimulation of separated HTX by-product fractions gave no evidence, that these portions of HTX have any immunological action. Therefore, these were considered to be impurities not required in the composition of the synthetic version.

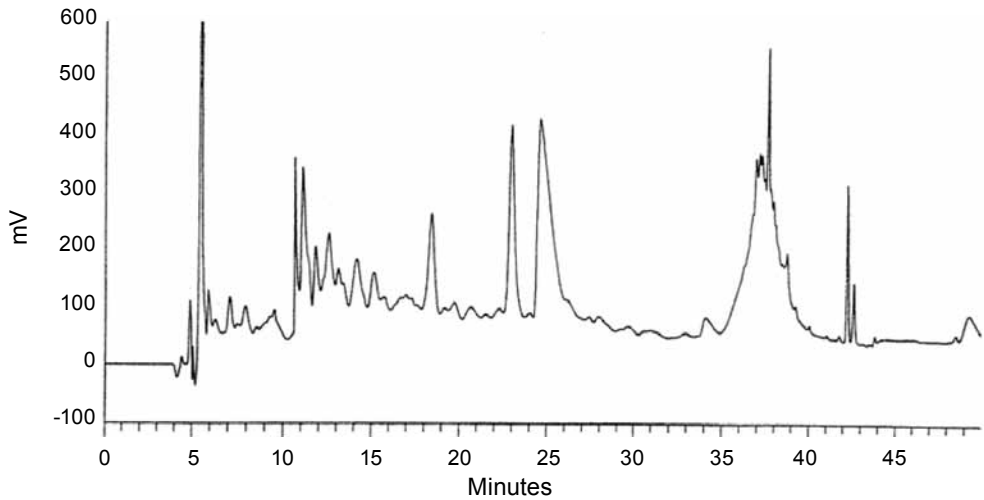


Fig. 1. RP-HPLC Analysis of synthetic SCTL (batch SP-01)

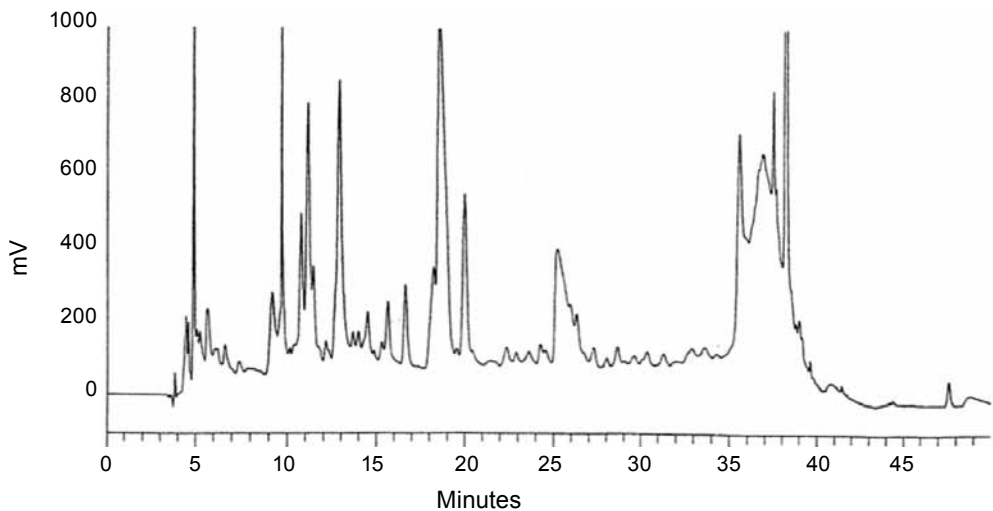


Fig. 2. RP-HPLC Analysis of natural HTX

The synthetic chemical product SCTL has no risk for BSE/TSE transmission as could be the case for natural HTX due to the route of manufacturing of the natural product from bovine thymus tissue. Moreover, the synthetic SCTL does not contain impurities like nucleic acids, sugars and fats, as it is caused for the natural product HTX through its route of manufacture from thymus tissue.

Table 2: Total amino acid composition in HTX and in SCTL for comparison

Batch	8863 (1)	8863 (2)	968	T.E.P.	Mean HTX	Theor. SCTL
Amino acid	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]	[% w/w]
Asp	8.87	9.20	9.77	7.60	8.86	6.05
Thr	2.83	3.18	3.42	5.19	3.65	3.55
Ser	1.32	1.81	1.85	5.29	2.57	3.30
Glu	14.87	14.94	15.51	14.68	15.00	8.36 ^{a)}
Pro	6.12	6.01	5.71	7.52	6.34	10.23 ^{a)}
Gly	10.10	9.47	8.91	10.11	9.65	24.74 ^{a)}
Ala	8,69	8.40	7.36	7.75	8.05	11.70
Cys	0.00	0.00	0.00	0.58	0.14	0.23
Val	6,44	6.57	6.22	6.28	6.38	6.15
Met	1.44	1.37	1.81	2.56	1.80	1.24
Ile	4.21	4.26	4.63	4.24	4.33	3.53
Leu	8.55	8.67	8.85	7.67	8.44	5.52
Tyr	0.48	0.39	0.91	0.00	0.44	0.14
Phe	3,64	3.60	4.05	3.66	3.74	2.07
Trp	0,00	0.00		0	0.00	0.00
His	1.13	1.08	1.04	0.43	0.92	0.47
Lys	11.90	11.34	11.07	8.49	10.70	6.94
Arg	9.41	9.70	8.89	7.96	8.99	5.77
Total	100	100	100	100	100	100

The Synthetic Combinatorial Thymus Tetrapeptide Library SCTL

The novel drug substance SCTL is a synthetic version of the former natural thymus partial hydrolysate HTX, originally prepared by enzymatic processing from calf thy-mus tissue. SCTL, mimicking the complex structure of the natural HTX, by synthetic means is composed of amino acids, di-, tri- and tetrapeptides in quantities and nature resembling the composition of partially hydrolyzed thymus tissue.

The drug substance SCTL is a synthetic statistical combinatorial thymus tetrapeptide library composed of:

a) Linear di-, tri- and tetrapeptides containing the residues R1-11 of the natural L amino acids Alanine, Arginine, Aspartate, Glutamate, Gly-

b) the 17 natural L amino acids or their HCl salts, respectively: Ala, Asp, Arg x HCl, Cys(H₂O) x HCl, Glu, Gly, His(H₂O) x HCl, Ile, Leu, Lys x HCl, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr and Val.

The Peptide Library SCTL

The synthetic drug substance SCTL is chemically manufactured from and consists only of the naturally occurring L-amino acids, either as free amino acids or as their statistical synthetic combinations in di-, tri- and tetrapeptides and their salts, respectively. These kinds of products are called combinatorial peptide libraries containing the individual amino acids and peptides in all statistically possible combinations. Because of the similarity of the individual components, the molecular quantities in traces of individual peptides in the library cannot be separated from each other and therefore cannot be determined individually. Only the statistical combination of all peptides in the library as a whole can be described and analysed. Therefore, the product SCTL for pharmaceutical development is considered a mono compound drug substance.

The molecular formula given above resembles the statistical combinatorial peptide library of different di-, tri- and tetrapeptides as well as free amino acids. The relative molecular masses have a range from 75 to 643, due to the content of Gly as lowest to a tetrapeptide consisting of (Arg)₄ as a maximum. SCTL is an off-white powder, which was manufactured at ORPEGEN, Germany (Birr et al., 1998).

The GMP-based carefully standardized manufacturing process is a six steps operation. In the first, third and fifth step carboxyl protected amino acids, di- and tripeptides, respectively, are coupled with N-protected amino acid derivatives. It was intended to synthesize a synthetic combinatorial peptide library containing trace amounts of monomers, di-, tri- and tetrapeptides similar to the low molecular weight fraction of a partial hydrolysate of calf thymus HTX. This is achieved by the limit of detection ($\leq 2\%$) of the photometric quantitative Ninhydrine method used as an in process control, IPC, carried out during each synthesis cycle of the manufacture. In the second and fourth step the terminal N-protecting groups are removed. In the final step the free peptides are obtained by catalytic hydrogenation of all remaining benzyl type protecting groups.

In all operations, the reactive side groups of those amino acids containing side functions are protected by Z- or OBzl groups, benzyl esters and (Z) benzyloxycarbonyl protection groups, respectively. Some of the protected amino acids are used as salts due to their better solubility and stability. All functional side chains of the natural L-amino acids remain protected during the synthesis up to the last step 6, where they are then deprotected simultaneously together with the N- and C-terminal protecting groups.

The absence of traces from benzyl-type protecting groups was proven by 300 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy in seven final drug substance batches of SCTL.

Also by capillary electrophoresis, CE, in a batch-to-batch consistency documentation the synthetic molecular identity of seven different batches of the combinatorial tetrapeptide library was demonstrated as shown in Fig. 3.

Assay for the biological standardisation of GMP-manufactured SCTL batches Mast cells contain the serine proteases tryptase and trypsin. Keratinocytes of human skin dispose receptors which are activated by serine proteases leading to changes in cell function which are not yet fully recognized and understood. In our search for an *in vitro* assay suitable for the biochemically standardized manufacture of SCTL batches, we have realized that SCTL inhibits tryptase and trypsin (Fig. 4). This way, we established this inhibitory action of SCTL on the enzymes as a quality control assay for the biochemical standardization of GMP-manufactured SCTL batches (Birr, 2005).

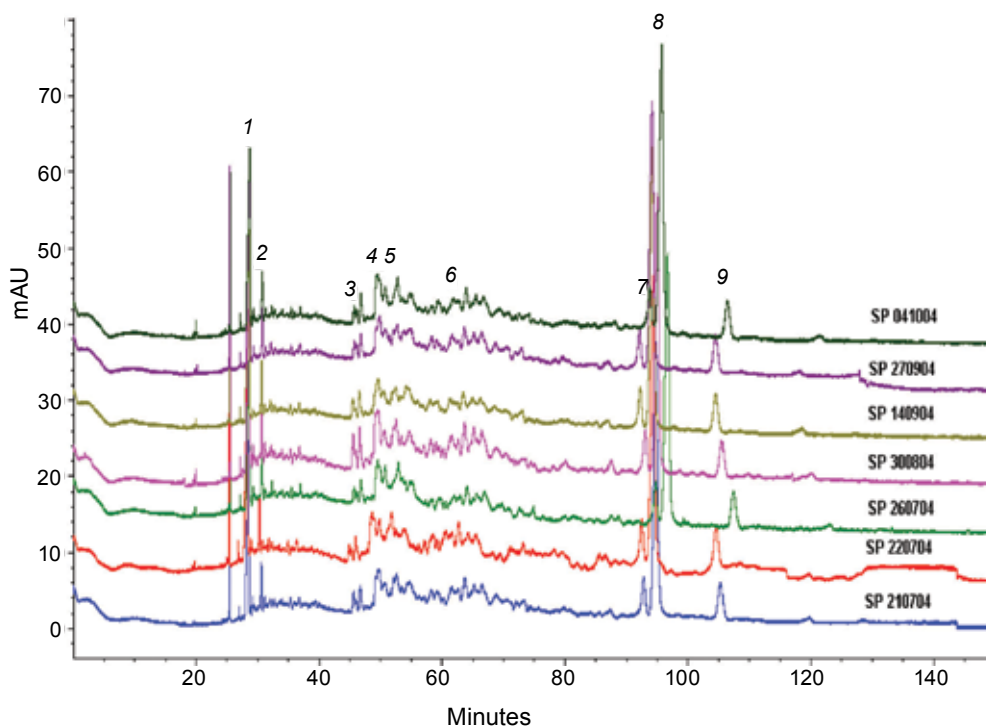


Fig. 3. Batch-to-batch consistency documentation by CE (Capillary Electrophoresis) on seven charges of SCTL manufactured under GMP restrictions

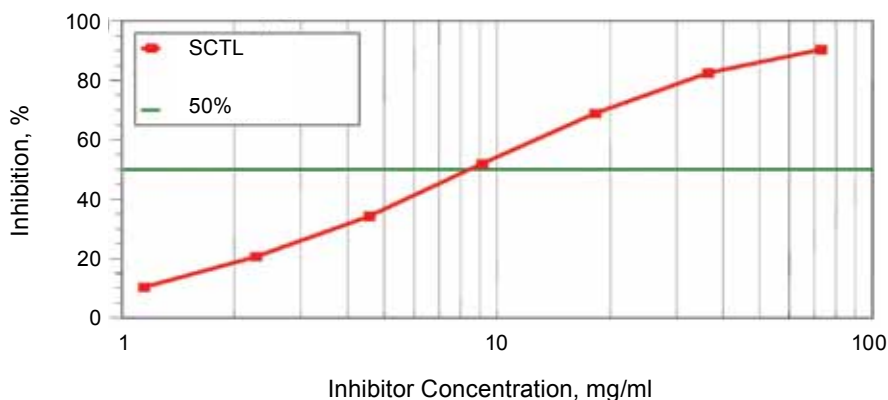


Fig. 4. Inhibitory Activity of SCTL on Trypsase

General Preclinical Considerations on SCTL applications

HTX as a partially hydrolyzed extract of calf thymus containing a mixture of short tissue-specific peptides and SCTL as its synthetic correlate might be compared to thymus peptides regarding their pharmacodynamics.

A number of crude thymus extracts and subsequently purified peptides with distinct biological properties have been prepared from thymus tissue and blood. The most important preparations are summarized in Table 4 (Schulof, 1985; Cazzola et al., 1987).

Table 4. Thymic Factors isolated from thymus tissue and characterized

Name	Abbr.	Content, size	Status	Origin
Thymosin		mixture of polypeptides	crude	rat thymus
Thymic factor X	TFX	mixture of polypeptides, MW ranging: 2,000-18,000 D	crude	calf thymus
Thymosin fraction 5	TF5	10 major and 30 minor polypeptides	purified	calf thymus
Thymostimulin	TP-1	mixture of polypeptides, MW ranging: 1,000-12,000 D	purified	calf thymus
Thymomodulin		mixture of peptides	purified	calf thymus
Prothymosin- α	Ta	113 amino acids	purified	rat thymus
Thymopoietin	TP	polypeptide, 5,562 D	purified	
Thymulin, Facteur Thymique Serique	FTS-Zn	nonapeptide, 847 D	purified	pig serum

Abbr.: abbreviations; D: Daltons

Action of Thymic Factors on T-cells

All of the naturally occurring thymus peptides mentioned above have been shown to augment T cell number and to modulate various T cell functions in man. Although many of the known thymic factors have similar activities in certain biological assays, it is likely that the respective thymic factors act essentially at different steps of the T-cell maturation (Cunningham-Rundles et al. 1999). In general, studies utilizing peripheral blood lymphocytes were aimed at assessing the influence of thymic factors on either T cell number or on T cell function, as well as on the maturation and differentiation of pre-T lymphocytes (Birr, 1993, 1994, 1996; Ciardelli et al., 1982.)

Effects of SCTL on Peripheral Blood Lymphocytes

The T cell activating property of SCTL was compared to that of HTX in two independent studies after prestimulation by phythemagglutinin (PHA; 0.05 – 0.4 µg/ml).

In one study performed with blood from only 2 donors, SCTL (25-100 µg/ml) increased the proliferation rate (e.g. by approx. 110% at 100 µg/ml), whereas HTX (25-100 µg/ml) caused a dose-dependent inhibition (e.g. by approx. 53% at 100 µg/ml) (Hirt, ORPEGEN 1996; Ho et al., 1987).

Substance	Dose, µg/ml	Effect	Significance
Control	0	1	-
PHA	0.4	2.33	$P < 0.01$
SCTL	10	1.38	$P = 0.03$
SCTL	50	1.46	
SCTL	100	1.82	
SCTL	200	1.49	
SCTL	500	1.21	

In the other study with blood of four donors, SCTL did not affect lymphocyte proliferation up to a dose of 500µg/ml (Maurer, 1999). HTX (10-500 µg/ml) exhibited the tendency to inhibit cell proliferation in a dose-dependent manner, but this effect was not statistically significant at the 5% level even at the highest concentration. When the effects of HTX and SCTL on lymphocyte proliferation were investigated in the absence of PHA, SCTL significantly stimulated cell proliferation at a single concentration, namely at 100 pg/ml ($p = 0.03$), whereas HTX had no effect. Summarizing these preliminary data, it may be suggested that SCTL and

HTX differentially affect lymphocyte proliferation: Some concentrations of SCTL may cause an increase of basal proliferation which is not affected by HTX, whereas stimulated proliferation is virtually not changed by SCTL, but may be inhibited by HTX. However, considering the limited number of individual donors included in these studies a final conclusion cannot be drawn from the present data.

Thymic factors increase the synthesis of soluble mediators by T-cells, most notably, T-cell growth factor (TCGF or IL-2) and gamma Interferon (INF- γ). This cytokine reactivity pattern is defined as T-helper type 1 response. IL-2 is released by activated T-cells and plays a pivotal role in sustaining both proliferative and cytotoxic immune responses. INF- γ augments T-cell cytotoxic activity but exhibits antiproliferative effects.

The effect of SCTL and HTX on PHA-induced and basal IL-2 secretion was investigated in human blood samples (Maurer, 1999).

In the presence of PHA (2.0 $\mu\text{g/ml}$), HTX (10-500 $\mu\text{g/ml}$) was ineffective. Only at the highest concentration used, SCTL (10-500 $\mu\text{g/ml}$) diminished IL-2 secretion, though without statistical significance ($p = 0.09$). In the absence of PHA, no statistically significant effects could be observed with either compound. However, the present data may suggest that by increasing the number of determinations/group (only 3 blood samples/group were used in the present study) a stimulation of IL-2 secretion by each compound might become statistically significant.

In another series of experiments, the effect of SCTL and HTX on IL-2-induced cytotoxicity was compared with each other (Maurer 1999). Leukocyte YT-cells with properties similar to natural killer (NK) cells were used in this study. YT-cells were co-incubated with K 562 target cells (20:1) preloaded with calcein AM fluorescence dye. Calcein release was used as a measure of cytotoxicity. SCTL (10, 50, and 250 $\mu\text{g/ml}$) decreased the cytotoxicity induced by IL-2 at each concentration investigated ($p < 0.01$), whereas HTX (10, 50, and 250 $\mu\text{g/ml}$) reduced cytotoxicity only at the highest concentration used ($p < 0.05$). In summary, both SCTL and HTX may inhibit IL-2 mediated cytotoxicity, the latter, however, with much lower potency.

In conclusion, thymic factors, HTX and SCTL increase the number of peripheral blood lymphocytes, activate mature and precursor cells and increase the production of IL-2 and INF- γ via T-helper type 1 response mechanism. Possibly, thymic factors, HTX and SCTL may be capable of exerting a homeostatic role in diseases associated with an imbalance of immunoregulatory T-cell activity. It seems that, for example, well defined thymic peptides like Thymosin- $\alpha 1$ (Birr et al., 1979) may be required for an early step of cortical thymocyte maturation, whereas the other defined peptide, TP-5 appears to be involved in later stages.

Local Tolerance

Examining SCTL for acute skin irritation in rabbits the fur was removed by shaving from the dorsal area of the trunk of the animals approximately 24 h before the test. Care was taken to avoid abrading the skin; only animals with intact skin were used.

A dose of 500 mg was applied on the test side and then covered with a gauze patch, which was fixed with non-irritating tape for 4 h. The surrounding untreated skin served as a control. The skin sites were evaluated before the application of the test substance. After the exposure period the patch was removed and the skin was evaluated. Scores were taken 60 min as well as 14, 48 and 72 hours after removal. Under the present conditions none of the 3 rabbits exposed to 500 mg SCTL showed substance related lesions. There were also no systemic intolerance reactions observed (Leuschner, 1997).

Moreover, SCTL and HTX were also tested in the EpiDerm®Skin Model (MatTek Corporation, Ashland, USA) for dermal irritation. This model consists of several layers of human keratinocytes and mimics human skin. The model substitutes for animal models used for testing skin irritation. In this model HTX and SCTL in a concentration of 10% in aqueous solution were not skin irritating (NeuroBiotec, 2005).

Toxicity

Acute toxicity of SCTL was investigated after a single i.v. injection to rats (Leuschner 1997). A dose of 10 mg/kg for the rat was used in the experiment. The appropriate solution was administered once i.v. at the above mentioned dose to 1 group of 10 animals. Subsequently the animals were observed at 5, 15, 30 and 60 minutes as well as 6 and 24 hours after the administration. After a 14 day observation period the animals were autopsied. No animal died, and in none of them any substance related findings were observed. Also at autopsy no findings were noted. The LD₅₀ could not be calculated yet, because not lethality had occurred in the rats. Repeated dose toxicity studies have not been performed so far for SCTL.

In summary, the study reveals a very low if any acute intravenous toxicity of SCTL. Deducted from this it is very unlikely that topical application of SCTL in lotions or cremes can cause toxicity.

The mutagenic potential of SCTL was examined in *Salmonella typhimurium* strains TA 98, TA 102, TA1535 and TA 1537, without and with metabolic activation by Aroclor. In the first experiment after treatment with 10000 µg SCTL/plate without metabolic activation complete cytotoxicity was observed for tester strain TA 102.

In the second experiment with metabolic activation complete cytotoxicity was observed for tester strains TA 98, TA 102 and TA 1537. A marginal toxicity was observed at the same dose for TA 1535 in both experiments and for the strains TA 98 and TA 1537 in the first experiment. A marginal cytotoxicity had been observed at 3160 µg/plate for the tester strain TA 1537.

In these experiments no mutagenic effect was observed for SCTL tested up to cytotoxic concentrations (3160 and 10000 µg/plate) in any of the 5 tester strains in two independent experiments with and without metabolic activation (Leuschner, 1997).

Preliminary Considerations on Clinical SCTL Applications

The GMP-based standardized manufacture of the drug substance SCTL has been established. The Common Technical Document on SCTL has been compiled by OR-PEGEN and presented at the FDA and the German BfARM for an IND approval on applications in clinical trials of different hair loss etiologies by the sponsor.

The author is aiming at clinical applications of SCTL in repairing the destructions of the cellular immune response resulting from virostatic and cytostatic chemo- and X-ray therapies. To date positive results are available only from private treatment of patients having suffered from opportunistic infections after chemotherapy. SCTL will be studied in topic, oral and parenteral applications probably at the NCT Heidelberg.

In another study towards prevention or reduction of allergic responses, the application of SCTL as a dietary supplement is considered. However, sponsors for these clinical applications of SCTL have not yet been identified.

References

1. *Birr Chr., Stollenwerk U.* Synthese von Thymosin- α 1, einem Polypeptid des Thymus. // *Angew. Chem.* – 1979. – **91**. – P. 422–423; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* – 1979. – **18**. – P. 394–395.
2. *Birr Chr., Ciardelli T. L., Brodner O., Incefy G. S.* Small Peptides of Thymic Origin Stimulate T-Lymphocytes Subsets. *Peptides* (V. Hruby and D. Rich, Eds.), Pierce Chem. Comp., Rockford, USA, 1983. – P. 885–888.
3. *Birr Chr.* Synthetic Small Thymic Peptides, an Immunoregulatory Concept. *Thymic Hormones & Lymphokines 1983* (A.L. Goldstein, Ed.), Plenum Publ. Corp., Washington, D.C. – 1984. – P. 97–109.
4. *Birr Chr., Bohn B., Jaeger K.-H.* Biochemical Characterization and Immunomodulatory Action of Thymic Components as Determined by Flow Cytometry on Human Lymphocytes // *Thymus.* – 1987. – **10**. – P. 159–168.

5. *Birr Chr., Nebe Th., Becker G.* Site specific differentiation induction on T cells in vivo by synthetic thymic peptides to fight microbial infections and cancer. Immunotherapy of Infections (K. N. Masishi, Ed.), Marcel Dekker, 1994.
6. *Birr Chr., Nebe Th., Becker G.* Synthetic Immunotherapeutic Peptide Drug Candidates. In: Peptides in Immunology (C. Schneider, Ed.), John Wiley & Sons, Ltd., 1996. – P. 185–196.
7. *Birr Chr., Braum G. Hirt W., Klett-Loch G. H.* Statistic Combination of Thymus Peptides, a Synthetic Library Mimicing the Physiological Environment In: Peptides 1998 (S. Bajusz, F. Hudecz, Eds.), Akademiai Kiado, Budapest, 1999. – P. 62–63.
8. *Birr Chr.* Peptides – An Increasing Demand in Molecular Immunology. In: Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis & Combinatorial Libraries (R. Epton, Ed.), Southampton, England, UK, 2002, pp. 137–142. Mayflower Scientific Ltd., Kingswinfort, UK, (2003).
9. *Birr Chr.* Development of a Bioassay for the Quality Control of the Drug Substance SCTL by Biological Means. Internal Report, 2005.
10. *Cazzola P., Mazzanti P., Kouttab N. M.* Update and future perspectives of a thymic biological response modifier (Thymomodulin). // Immunopharmacol. Immunotoxicol. – 1987. – **9**. – P. 195–216.
11. *Ciardelli T. L., Incefy G. S., Birr Chr.* The Activity of Synthetic Thymosin- α 1, C-terminal Peptides in the Azathioprine E-Rosette Inhibition Assay // Biochemistry. – 1982. – **21**. – P. 4233–4237.
12. *Cunningham-Rundles S., Harbison M., Guirguis S. et al.* New perspectives on use of thymic factors in immune deficiency // Ann. NY Acad. Sci. – 1999. – **730**. – P. 71–83.
13. *Hirt W.* Bioaktivität – Statistisches Tetrapeptidgemisch SP/01/211096. – 1996.
14. *Ho A. D., Stehle B., Birr Chr. et al.* Differentiation Changes in Cord Blood T-Lymphocytes Induced by Synthetic C-Terminal Peptides of Thymosin- α 1 // Thymus. – 1987. – **9**. – P. 77–84.
15. *Leuschner J.* Acute skin irritation test (patch test) of SCTL (ORPEGEN) in rabbits. LPT Report No 102008/96 (from 1/13/1997).
16. *Leuschner J.* Acute toxicity study of SCTL (ORPEGEN) by intravenous administration to Sprague-Dawley rats. LPT Report No 10207/96 (of 2/12/1997).
17. *Leuschner J.* Mutagenicity study of SCTL (ORPEGEN) in the Salmonella typhi-murium reverse mutation assay (*in vitro*). LPT Report No 10703/97 (of 9/12/1997).
18. *Lüpke N. P.* Zusammenfassender Bericht zur adjuvanten lokalen Anwendung von SCTL Präparationen bei Patienten unter zytostatischer Chemotherapie // Deutsche Zeitschrift für Onkologie. – 1990. – **22**. – P. 13–20.
19. *Maurer H. R.* Preclinical investigation of thymic preparations HTX and SCTL // Intern. Invest. Report. – 2005.

20. *NeuroBiotec*: Investigations of skin irritation of SCTL as aqueous solutions (10%) using the EpiDerm® model MatTek Corporation, Ashland, USA // Intern. Invest. Report. – 2005.
21. *Schulof R. S.* Thymic peptide hormones: Basic properties and applications in cancer. CRC // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 1985. – **3**. – P. 309–376.

General remark: In other publ. GKL-02 stands for SCTL, and GKL-01 for HTX, respectively.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Т. С. СААТОВ, А. А. АБДУВАЛИЕВ

*Институт биоорганической химии Академии наук
Республики Узбекистан, Ташкент;
e-mail: t.saatov@yandex.ru*

В статье приведены результаты исследования многофункционального действия тиреоидных гормонов в отношении нормальных и злокачественно трансформированных тканей и клеток. Описаны «быстрые» и «медленные» эффекты действия гормонов, включающие калоригенные эффекты и эффекты через систему аденилатциклаза – сАМР.

Установлено, что тироксин (Т4) способен ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз клеток, несущих на своей мембране рецепторы к Т4 и способных изменять течение метаболических процессов под его воздействием. Спектр Т4-мишеней довольно широк, и в сферу его управления входят не только клетки гормонпродуцирующих органов, например, молочной железы и толстой кишки, но и другие типы клеток, в частности меланинсодержащие, а Т4-эффекты приводят к перестройке в презентации регуляторных белков на поверхности мембраны клеток, что, в конечном результате, и может активизировать процесс апоптотической гибели клеток.

Полученные нами результаты помогают определить альтернативные пути гормональной регуляции пролиферации и апоптоза клеток гормонозависимых опухолей, и, в частности, рака молочной железы, при невозможности регулировать эти процессы традиционными методами. Это помогает понять механизмы активации сигнальной системы клеток рака молочной железы гормонами при наличии изменений в экспрессировании рецепторов на поверхности клеток, в свою очередь, позволит выработать новую стратегию заместительной терапии гормонозависимых опухолей при низкой эффективности консервативного лечения.

Многогранное действие гормонов щитовидной железы: тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3) на физиологические функции, скорость метаболических процессов, на активность различных ферментных систем как в целом организме, так и в препаратах тканей, известно уже давно. Природа этих явлений довольно разнообразна: инициация метаморфоза амфибий, влияние на развитие структуры и организацию нервных элементов в центральной нервной системе и появление первичных центров оксификации в костях, влияние на поглощение кислорода целым организмом или

препаратами тканей *in vitro*, на различные стороны обмена веществ и на активность отдельных ферментов [1]. Многочисленные данные литературы показывают, что основное действие гормонов щитовидной железы направлено на биохимические процессы биосинтеза белка и митохондриальное дыхание. В 60-е годы прошлого столетия ряд исследователей сформулировали гипотезу, согласно которой тиреоидные гормоны оказывают прямое действие на митохондрии, что приводит к разобщению окислительного фосфорилирования [2–5]. Этот эффект Т4 и Т3, наблюдаемый как в митохондриях, выделенных из ткани гипертиреоидных крыс, так и при добавлении тиреоидных гормонов к суспензии митохондрий *in vitro* считается ключевым, а все последующие изменения на уровне тканей, включая изменение поглощения кислорода, ферментативной активности, синтеза белка – вторичными феноменами.

В те же годы Tata [6] выдвинул противоположную гипотезу, согласно которой физиологическая реакция на действие тиреоидных гормонов опосредуется через активирование генетического аппарата клетки с усилением биосинтеза специфических белков.

Как видно, метаболические эффекты тиреоидных гормонов реализуются, по крайней мере, двумя путями: путем стимуляции сигнального пути аденилатциклаза – сАМР и путем связывания ядерными рецепторами и стимуляции генетической активности [1, 7–9]. Следовательно, в многофункциональном действии тиреоидных гормонов можно разделить их «быстрые» и «медленные» эффекты. Быстрые реакции развиваются в течение первых минут, и включают в себя калоригенные эффекты и эффекты через систему аденилатциклаза – сАМР. Медленные «продолжительные» эффекты развиваются через несколько часов. Они предотвращаются ингибиторами синтеза белка и нуклеиновых кислот.

Пусковым механизмом быстрых клеточных ответов на тиреоидные гормоны является их действие на плазматическую мембрану и митохондрии. На плазматической мембране тироксин путем взаимодействия со специфическим рецептором стимулирует активность аденилатциклазы с последующим увеличением внутриклеточной концентрации сАМР. Последний, в свою очередь, через протеинкиназную реакцию активирует ферменты и усиливает метаболические процессы в клетке [10].

Медленные эффекты тиреоидных гормонов обусловлены активацией соответствующих генов. Эта активация опосредована через цитозольные рецепторы, которые затем перемещаются в ядро, где происходит взаимодействие гормонрецепторного комплекса с ДНК и

хроматином и усиление синтеза соответствующего матричного РНК [7].

В нашей лаборатории с использованием радиолигандного метода и метода флуоресцентных зондов доказано специфическое связывание тироксина с препаратами высокоочищенных плазматических мембран печени и мозга крыс. Установлено наличие двух тироксин-связывающих мест, различающихся как сродством, так и гормонсвязывающей емкостью [11, 12]. Установлено влияние липидного состава плазматических мембран печени и мозга на параметры связывания тироксина с рецептором [8, 13, 14]. В дальнейшем рецептор тироксина был выделен и очищен из плазматической мембраны печени крыс. Очищенный рецептор является гликопротеином с молекулярной массой 40 кДА, состоит из 322-х остатков аминокислот и удерживается в мембране за счет гидрофобных взаимодействий [9]. Установлено, что высокоочищенный рецептор теряет способность связывать тироксин вследствие делипидизации в процессе очистки. Связывающая способность рецептора восстанавливается путем встраивания его в искусственную фосфолипидную мембрану, что указывает на важную роль мембранных липидов в реализации гормонального эффекта тироксина.

Другая группа исследователей нашей лаборатории [15] также занималась проблемой рецепции тиреоидных гормонов на клеточной мембране. Было исследовано взаимодействие меченого ^{125}I -тироксина с изолированными плазматическими мембранами клеток печени крыс и установили специфическое связывание меченого гормона с этими мембранами. Расчеты, проведенные в координатах Scatchard, выявили высокое сродство (K_{acc} равна $6,4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$) и ограниченную емкость связывания тироксина (максимальная связывающая способность равна 14 нМ Т4 на 1 мг белка). Обнаружено, что немеченый тироксин и трийодтиронин проявляют конкуренцию за места связывания с ^{125}I -Т4, причем конкурирующая способность у Т3 была выше, чем у холодного Т4. Этот факт наводит на мысль, что в плазматической мембране клеток печени имеются рецепторы для Т3. Результаты наших исследований относительно рецепции Т4 на уровне плазматических мембран клеток были подтверждены в экспериментах французских ученых Gharbi и Torresani [16, 17]. Они установили наличие в очищенных препаратах плазматических мембран печени крыс участков связывания Т4 двух типов с высоким сродством. Места с высоким сродством связывания Т4 не обнаружены в препаратах грубых и гладких микросомных фракций, а также в цитозоле. По данным этих авторов Т4 связывается с высокой стереоспецифично-

стью как при замене йода в молекуле тиронина, так и при модификации в аланиновой цепочке молекулы гормона.

Как известно, связывание гормона с рецептором оказывает положительное стимулирующее влияние на аденилатциклазу, вызывая её активацию. На высокоочищенных препаратах плазматической мембраны печени крыс нами установлено, что Т4 стимулирует активность системы аденилатциклаза – сАМР.

В наших исследованиях стимулирующий эффект Т4 на активность аденилатциклазы доказан в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro*.

На экспериментальной модели гипертиреоза у крыс, вызванного путем введения Т4 в течение пяти дней в дозе 1 мг/кг веса показано достоверное повышение активности аденилатциклазы в плазматических мембранах ряда органов. Так, в плазматической мембране печени наблюдалась стимуляция активности фермента на 23, сердца – на 67 и почек – на 46% по сравнению с нормой. У тиреоидэктомированных крыс в плазматических мембранах вышеуказанных органов мы отмечали ингибирование активности аденилатциклазы, которое составляло в печени – 32, сердце – 44 и в почках – 26% по отношению к контролю. Следует отметить, что избыток или недостаток тиреоидных гормонов в организме экспериментальных животных не оказывает влияния на активность аденилатциклазы в плазматических мембранах селезенки и мозга, считающихся органами неотзывчивыми к действию гормонов щитовидной железы.

Исследования, проведенные в условиях *in vitro*, путем добавления экзогенного Т4 в плазматические мембраны органов-мишеней у крыс также показали стимуляцию активности аденилатциклазы. При этом установлена дозовая зависимость влияния Т4 на активность аденилатциклазы. Т4 при физиологических концентрациях (10^{-8} М) приблизительно в 1,5 раза стимулирует активность фермента в плазматических мембранах печени, почек и сердца по сравнению с контрольными значениями. В противоположность этому инкубация плазматических мембран изученных органов с токсическими дозами гормона (10^{-4} М) вызывает заметное торможение активности аденилатциклазы. Различные концентрации Т4 не оказывают существенного эффекта на активность аденилатциклазы в плазматических мембранах селезенки и мозга крыс.

Таким образом, представленные данные доказывают, что метаболические эффекты гормонов щитовидной железы реализуются путем взаимодействия со специфическим рецептором на плазматической мембране и запуском аденилатциклазной реакции с повышением внутриклеточной концентрации сАМР.

В механизме действия тиреоидных гормонов особое место занимает их участие в процессах апоптоза и пролиферации клеток. Эта проблема интенсивно разрабатывается в последние 10–15 лет. В литературе накоплено уже достаточно данных о том, что гормоны щитовидной железы могут индуцировать развитие апоптоза в различных типах клеток. Анализ механизма апоптогенного действия тиреоидных гормонов указывает на то, что они оказывают влияние на процесс апоптоза на различных этапах его развития и по различным механизмам: как активированием митохондриальных и цитоплазматических процессов, так и активированием специфических генов.

Результаты исследования, проведенные в последние годы, позволяют утверждать, что влияние Т4 или препаратов на его основе на различные метаболические процессы, протекающие в органах и тканях организма, может приводить к индуцированию апоптоза и снижению пролиферативной активности в клетках различной этиологии. Это касается как нетрансформированных клеток, таких как клетки молочной железы [18], β -клетки поджелудочной железы [19], так и злокачественно пролиферирующих клеток, в частности рака молочной железы [20] и кожных лимфом [21].

Первые сведения о возможном эффекте тиреоидных гормонов на апоптоз клеток получены при изучении метаморфоза головастиков. В присутствии Т4 наблюдалось ускорение метаморфоза головастиков в лягушки и при этом исчезновение хвоста происходило в результате запуска программы апоптоза.

В нашей лаборатории были изучены особенности механизма регуляции пролиферации и программированной гибели – апоптоза – в опухолевых клетках различного генеза при действии тиреоидных гормонов.

Нами были проведены исследования на изолированных опухолевых клетках перевиваемого штамма аденокарциномы толстого кишечника АКАТОЛ у мышей линии BALB/c. Сразу же после внесения препарата Т4 проводился прижизненный анализ состояния ядра и цитоплазмы нескольких выбранных и зафиксированных в поле зрения клеток. К концу анализируемого периода (45 мин – достоверная продолжительность жизни клеток *in vitro* в контроле) было отмечено постепенное изменение состояния хроматина ядра до маргинации и образование апоптозных телец, а также изменение цитоплазмы с образованием выпячиваний и протуберанцев. Таким образом, было показано, что воздействие Т4 в концентрации 10^{-4} М вызывает апоптоз опухолевых клеток штамма АКАТОЛ в эксперименте *in vitro*.

Воздействие Т4 на клетки доброкачественной опухоли щитовидной железы в течение 24 ч *in vitro* оказалось дозозависимым и вы-

зывало цитотоксический эффект у значительного количества клеток (рис. 1).

Наибольшую цитотоксическую активность Т4 проявлял в дозе 10^{-8} М. Индуцирование гибели клеток Т4 в остальных разведениях статистически достоверно не различалось и варьировало в пределах 40–50%. Количество апоптотных клеток в опыте с применением Т4 в дозе 10^{-8} М также было самым большим ($9,0 \pm 0,90\%$, $P < 0,05$) по сравнению с остальными концентрациями ($3,2 \pm 0,55\%$, $P < 0,05$; $2,5 \pm 0,49\%$, $P < 0,05$; $4,5 \pm 0,65\%$, $P < 0,05$; $5,0 \pm 0,68\%$, $P < 0,05$ для концентраций Т4 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} М соответственно) и контролем ($1,0 \pm 0,30\%$). Одним из регуляторных белков, отвечающих за пролиферацию клеток, в частности эпителиальных, является HER2/neu (C-erbB-2). HER2/neu – онкогенный белок массой 185 кДа, принадлежащий к семейству рецепторов эпидермального фактора роста EGFR [22]. Активация HER2/neu вызывает внутриклеточные сигнальные изменения, которые являются критическими для роста, дифференцировки и выживания клеток. При патологических трансформациях ткани молочной железы экспрессия HER2/neu увеличивается, а при лекарственной терапии уменьшение представительства этого рецептора на мембране клеток говорит о хорошем прогнозе лечения заболевания. В случае изучения биологических эффектов Т4 мониторинг изменения представительства HER2/neu на мембране клеток молочной железы может помочь раскрыть механизм ингибирования пролиферативной активности этой ткани. Мы исследовали количественные характеристики нахождения рецепторов HER2/neu на мембране опухолевых клеток молочной железы при воздействии Т4 *in vitro* в дозах 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М (рис. 2).

Воздействие Т4 во всех концентрациях привело к уменьшению количества рецепторов HER2/neu на мембранах клеток молочной железы в среднем на $27,25 \pm 1,14\%$, $P < 0,001$. Столь значительные изменения могут быть связаны с ингибированием пролиферативной активности Т4 исследуемых клеток посредством сигнального управления от Т4-опосредованных рецепторов.

В эксперименте *in vitro* на культуре опухолевых клеток рака молочной железы и куриных фибробластов было исследовано воздействие Т4 как на опухолевые, так и на нетрансформированные клетки (рис. 3). Проведение подобного эксперимента позволило установить следующее: в дозах воздействия Т4 (10^{-5} М) происходит ингибирование роста как опухолевых, так и нетрансформированных клеток (3,64 и 3,01% деструкции клеточного слоя соответственно), причем эти данные, как и в случае использования Т4 в концентрации 10^{-8} М сопоставимы с результатами контрольного опыта, что говорит о не-

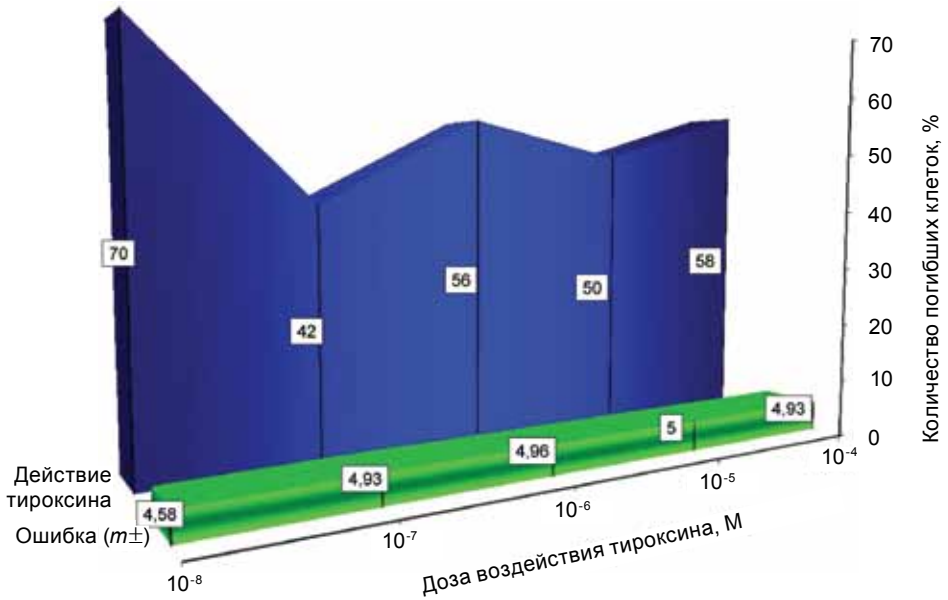


Рис. 1. Действие тироксина (Т4) на клетки доброкачественной опухоли щитовидной железы в эксперименте *in vitro*. Время инкубации – 24 ч. Для всех значений опытных групп $P < 0,05$

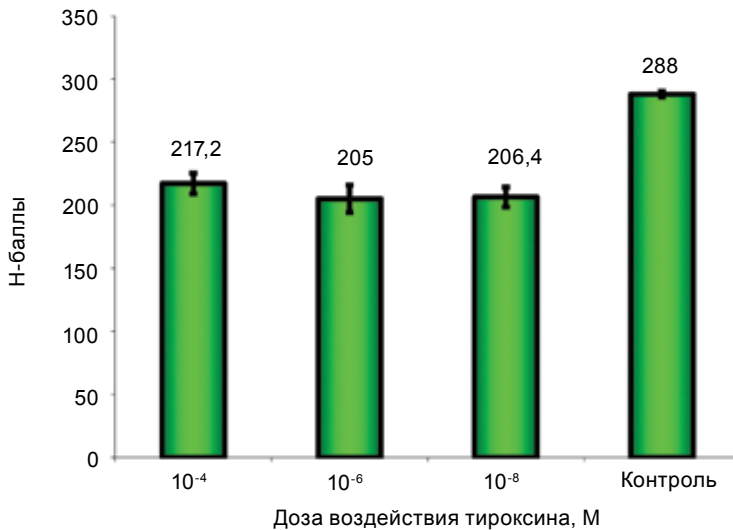


Рис. 2. Количественные изменения представительства HER2/neu на мембранах клеток молочной железы с патологией гинекомастии при воздействии тироксина (Т4) *in vitro*. Время инкубации – 24 ч. Для всех значений опытных групп $P < 0,001$

эффективности подобных доз Т4 для ингибирования пролиферации клеточных моделей. В концентрациях Т4 10^{-7} и 10^{-6} М ингибирование клеточного роста происходит более эффективно, однако, если сравнивать подобное воздействие в отношении клеток рака молочной железы и куриных фибробластов, можно увидеть значительные отличия (рис. 3). Так, в концентрации 10^{-6} М Т4 преимущественно тормозит рост куриных фибробластов (38,82% деструкции клеточного слоя), в то время как ингибирование роста клеток рака молочной железы было более слабым (5,16% деструкции клеточного слоя). При концентрации Т4 10^{-7} М подобная диспропорция принимает обратный порядок и ингибирование пролиферации рака молочной железы (18,72% деструкции клеточного слоя) превышает ингибирование роста клеток куриных фибробластов (11,58% деструкции клеточного слоя). Полученные данные позволяют сделать вывод, что воздействие Т4 на опухолевые и нетрансформированные клетки является дозозависимым, а наиболее приемлемой концентрацией для ингибирования роста клеток рака молочной железы в эксперименте *in vitro* является 10^{-7} М.

В эксперименте *in vivo* на модели опухолевого штамма меланомы В-16 была определена противоопухолевая активность L-тироксина. Экспериментальные животные были разбиты на 3 группы: I группа – животные получали Т4 в дозе 1 мг/кг внутривенно в физиологическом растворе (10 инъекций); II группа – животные получали Т4 в дозе 0,1 мг/кг внутривенно в физиологическом растворе (10

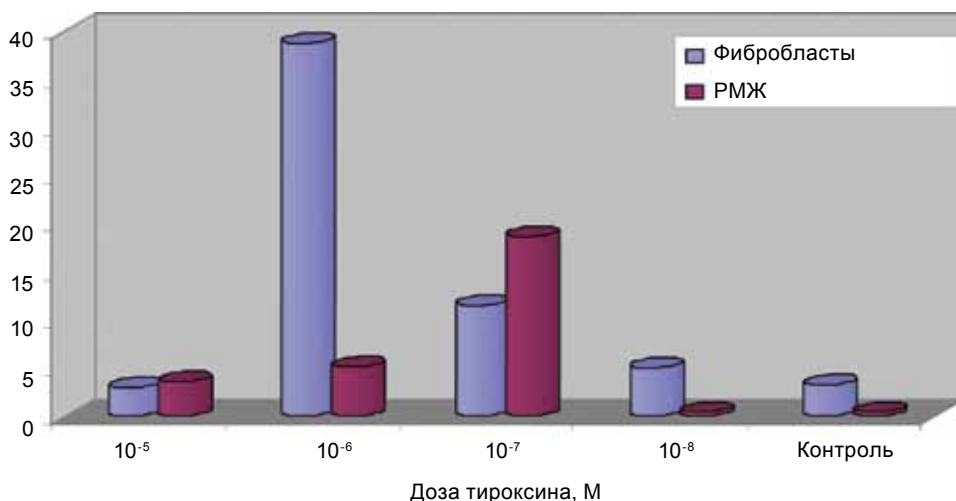


Рис. 3. Влияние тироксина (Т4) на деструкцию монослоя куриных фибробластов и клеток рака молочной железы

инъекций); III группа – контроль, животные получали растворитель (физиологический раствор, 10 инъекций).

В табл. 1 представлены результаты противоопухолевой активности Т4 в используемых дозах 1,0 мг/кг и 0,1 мг/кг. Введение животным Т4 в высоких концентрациях (1,0 мг/кг, группа I) вызывает тенденцию к уменьшению роста опухолевой ткани (ТРО – 50,6%). Уменьшение дозы Т4 до 0,1 мг/кг оказывает высокую противоопухолевую активность (ТРО – 91,4%). Как в случае использования Т4 в высоких дозах, так и при снижении действующей концентрации гормона имеет место цитотоксическая гибель опухолевых клеток в результате нарушения жизненно важных функций, регулируемых Т4: перестройке в презентации регуляторных белков на поверхности мембраны клеток, изменение секреции гормонов и коррекции Ca^{2+} -гомеостаза. Однако при использовании высоких доз Т4 возникает риск возникновения рецепторцитоза, что может привести к снижению терапевтических эффектов гормона. В нашем исследовании, по-видимому, высокая доза использования Т4 (1,0 мг/кг, группа I) привела к рецепторцитозу, что не позволило достичь эффективной концентрации гормона в опухолевых клетках для подавления их жизнедеятельности.

Таким образом, Т4 в дозе 0,1 мг/кг проявляет высокую противоопухолевую активность, тогда как повышение дозы воздействия гормона до 1,0 мг/кг не приводит к статистически достоверному торможению роста опухоли меланомы В-16.

В табл. 2 представлены результаты определения количества делящихся клеток и формы протекания митозов в опухолевой ткани меланомы В-16 под воздействием Т4. Как видно из представленных

Таблица 1. Изменение массы и объема опухоли меланомы В-16 у экспериментальных животных после введения L-тироксина (Т4) ко дню окончания эксперимента (16-й день) ($M \pm m$; $n = 30$)

Группа	Доза воздействия (количество введений), мг/кг	Масса опухоли, г	Объем опухоли, см ³	Торможение роста опухоли, %
Группа I	1,0 (10)	0,3656 ± 0,108	0,55 ± 0,16	50,59
Группа II	0,1 (10)	0,0634 ± 0,011*	0,020 ± 0,006	91,43
Группа III (контроль)	–	0,740 ± 0,072	0,67 ± 0,18	–

* $P < 0,05$

Таблица 2. Митотическая активность и апоптоз клеток экспериментальной опухоли меланомы В-16 при воздействии L-тироксина (Т4)

Группы	Доза, мг/кг	Количество исследованных клеток	Количество митозов, %		Метафазы, %		Анафазы, %		К-митоз	АИ, %	МИ, ‰
			норма	патология	норма	патология	норма	патология			
Группа I	1,0	6000	5,17 ±0,40	94,83 ±0,40	1,29 ±0,20	85,16 ±0,64	3,87 ±0,35	—	9,67 ±0,53	6,25 ±0,47*	4,60 ±0,36
Группа II	0,1	6000	7,70 ±0,59	92,30 ±0,59	—	76,92 ±0,94	7,69 ±0,59	—	15,38 ±0,80	10,65 ±1,39**	1,30 ±0,16***
Группа III (контроль)	—	6000	11,20 ±0,57	88,80 ±0,57	7,46 ±0,47	88,05 ±0,59	3,73 ±0,34	0,74 ±0,15	—	4,43 ±0,40	4,96 ±0,43

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$

данных, в опухолевой ткани преобладают патологические формы деления клеток, различий в процентном отношении патологических форм митоза между опытными группами не наблюдается. Примечательно, что в опытных группах под действием гормона появляются К-митозы. Появление этих форм патологического деления обычно иллюстрирует цитотоксические проявления действия биологически активных веществ.

В срезах опухолей у контрольной группы животных клеток с конденсированным хроматином было незначительное количество ($3,5\% \pm 0,4$). Большинство опухолевых клеток активно делятся преимущественно с патологичным протеканием митоза (МИ $4,96 \pm 0,43$). Некротические участки маленьких размеров встречаются редко. В целом, исследуемая ткань представляет собой низкодифференцированный клеточный массив с высокой митотической активностью, с повсеместным прорастанием мышечных волокон, с тенденцией к разрастанию.

При микроскопировании срезов опухолей животных, получавших Т4 в дозе 0,1 мг/кг (группа II) митотическая активность ткани оказалась невысокой, преимущественно с патологическим протеканием стадий деления – чаще встречаются патологические метафазы (МИ $1,30 \pm 0,16$). Исследуемая ткань представляет собой высокодифференцированный клеточный массив с низкой митотической активностью, с повсеместным протеканием процессов некроза, с тенденцией к деградации ткани.

В опухолевой ткани экспериментальных животных группы I, получавших Т4 в дозе 1,0 мг/кг, значительных морфологических изменений в сравнении с гистологическими препаратами контрольной группы не наблюдается. Большое количество опухолевых клеток находятся в стадии активного деления, преимущественно с патологическим протеканием митоза (МИ $4,60 \pm 0,36$). Таким образом, исследуемая ткань представляет собой низкодифференцированный клеточный массив с высокой митотической активностью.

Другим параметром, отражающим процессы гибели опухолевых клеток, является апоптотический индекс (АИ). Важность этого параметра для построения адекватной картины кинетических процессов опухолевой ткани объясняется отличиями в ином цикле деления опухолевых клеток. В частности, при трансформации клетка приобретает способность переходить в G_1 -фазу (подготовка к синтезу ДНК) из G_0 -фазы (состояние клетки до получения стимула деления) и проходить весь цикл деления без внешней или при ослабленной стимуляции [23]. Продолжительность фаз G_1+S+G_2+M у опухолевых клеток не уменьшается по сравнению с нормой. Механизм интенсив-

ного нестимулированного деления опухолей связан в большинстве случаев с мутацией в протоонкогене, кодирующем белок-рецептор в клеточной мембране и делающем этот белок постоянно активированным, передающим сигналы к делению по цепи внутрь клетки, или с мутациями в генах одного из промежуточных белков, что также приводит к его постоянной активации и к передаче сигнала следующим компонентам цепи [24].

Воздействие противоопухолевых препаратов на ингибирование пролиферации патологических тканей должно приводить к прерыванию в цепи стимулирования деления путем влияния на рецепторы или белки, отвечающие за митоз, или к изменениям в геноме клетки. В обоих случаях мы можем говорить об активации механизмов программируемой клеточной гибели, или апоптозе. Поэтому при проведении анализа пролиферативной активности опухолевой ткани невозможно говорить о прогрессирующем или же, наоборот, регрессирующем характере этого процесса только учитывая количество митозов, так как при морфологическом анализе невозможно адекватно оценить абсолютно все количество делящихся клеток из-за скоротечности некоторых фаз митоза, а апоптозный индекс вместе с митотическим индексом дает объективную оценку процессам роста или гибели опухоли.

В табл. 2 представлены результаты определения апоптотического индекса (АИ) в опухолевой ткани меланомы В-16 под действием Т4 в дозах 1,0 мг/кг (группа I) и 0,1 мг/кг (группа II). При всех использованных дозах гормона наблюдается увеличение количества апоптотических клеток. Наибольшие значения АИ наблюдаются в группе II (АИ = $10,65 \pm 1,39\%$), наименьшие – в контрольной группе экспериментальных животных (АИ = $4,43 \pm 0,40\%$).

Следует также отметить, что во всех опытных группах количество опухолевых клеток, находящихся в стадии апоптотической гибели, превышает количество митотически делящихся клеток, тогда как в контрольной группе животных значения МИ превосходят значения АИ, что говорит о росте опухолевой ткани. Индекс роста опухолевой ткани (ИРО), т.е. отношение количества апоптотических клеток к количеству клеток, находящихся в состоянии деления – АИ/МИ – позволяет оценить скорость регрессии или прогрессии опухоли. В случае получения значений менее 1,0 мы имеем место с прогрессией опухолевой ткани, так как количество митотически делящихся клеток превосходит количество гибнущих клеток, а в случае получения значений АИ/МИ > 1,0 – мы имеем место с регрессией опухоли, соответственно значения показывают скорость роста или гибели опухолевой ткани.

В табл. 3 приведены значения ИРО (АИ/МИ) для всех опытных групп. Как видно из полученных значений, и в случае применения Т4 в дозе 1,0 мг/кг, и в дозе 0,1 мг/кг, опухолевая ткань регрессирует, при этом степень регрессии значительна для опухолевых образцов группы II. В то же время, опухолевая ткань в контрольной группе животных прогрессирует, т.е. увеличивает свою клеточную популяцию.

С целью исследования влияния Т4 на ингибирование роста раковых клеток различного гистогенеза нами были проведены эксперименты по изучению цитотоксических эффектов этого гормона на клетки рака молочной железы. Выбор этого опухолевого заболевания не случаен. Рак молочной железы относится к одной из наиболее частых опухолей человека и является главной причиной смертности женщин среднего возраста в экономически развитых странах. Заболеваемость раком молочной железы у женщин в России составляет 18,9–20,4% в структуре злокачественных новообразований, а в Узбекистане, несмотря на более низкую заболеваемость, чем в странах Европы, частота развития опухолей молочной железы не обнаруживает тенденции к снижению [25]. Другой причиной выбора этого объекта для наших исследований явилось то, что пролиферация клеток рака молочной железы находится под влиянием ряда гормонов, основными из которых являются эстрогены и прогестерон. Однако в последние годы с приходом в клиническую практику новых диагностических наборов по определению экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону было установлено, что отсутствие на поверхности клеток рака молочной железы рецепторов этих гормонов не позволяет придерживаться традиционной терапии этого заболевания и требует изменения фармакологического воздействия, при этом данная патология встречается приблизительно у 15% пациентов [26]. Исходя из этого, нами было сделано предположение о возможности регуляции Т4 пролиферации клеток рака молочной железы в

Таблица 3. Индекс роста опухоли (ИРО) меланомы В-16 после введения L-тироксина ко дню окончания эксперимента (16-й день)

Группа	Доза воздействия (количество введений), мг/кг	АИ/МИ
Группа I	1,0 (10)	1,35
Группа II	0,1 (10)	8,19
Группа III (контроль)	—	0,89

случае невозможности воздействия на этот процесс традиционными агентами.

С помощью иммуногистохимического метода анализа нами были обследованы образцы 6 опухолей молочной железы разного генеза, полученных из операционного материала пациентов Республиканского онкологического научного центра МЗ РУз (г. Ташкент). В четырех из шести образцов опухолевой ткани молочной железы количество рецепторов к эстрогенам и прогестерону соответствовало 2+ и 3+ баллам, то есть в этих клетках отсутствовали генетические нарушения экспрессии рецепторов к эстрогенам (рис. 4). В одном из шести образцов опухолей представительство рецепторов к эстрогенам и прогестерону было незначительно и соответствовало 1+ баллу. И только один образец трансформированных клеток молочной железы показал полное отсутствие рецепторов к эстрогенам и прогестерону — 0 баллов (рис. 5). Для проведения дальнейших экспериментов нами был взят опухолевый материал как с наличием, так и с полным отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону.

После культивирования клеток рака молочной железы с наличием рецепторов к эстрогенам и прогестерону и получения слоя средней плотности этих клеток в лунки полистиролового планшета вносили Т4 в концентрациях 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М. Здесь следует отметить, что концентрация гормона в 10^{-8} М является физиологической, т.е. соответствует концентрации гормона в организме в норме, она

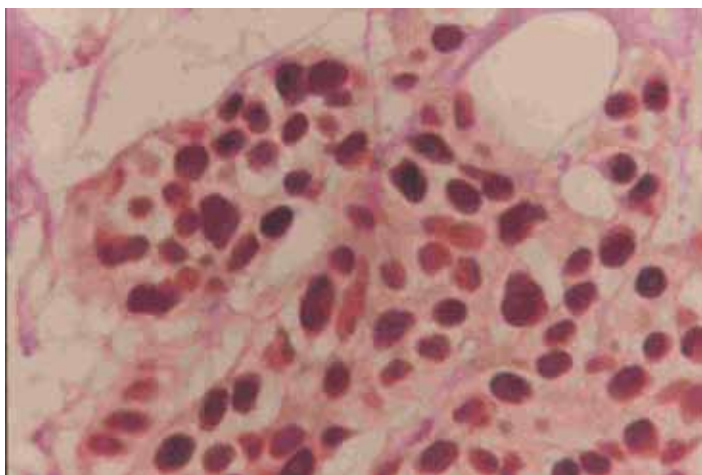


Рис. 4. Рак молочной железы. Резко положительная иммуногистохимическая реакция на рецепторы к эстрогенам и прогестерону (3+). Иммунопероксидазный метод. Ок. 10х, об. 40х

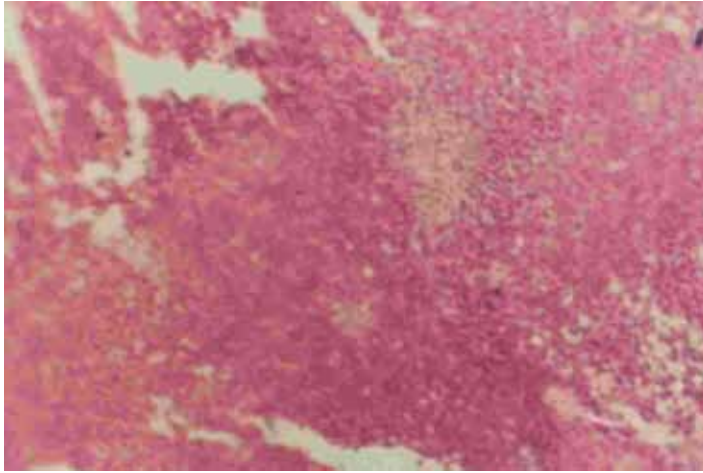


Рис. 5. Рак молочной железы. Отрицательная иммуногистохимическая реакция на рецепторы к эстрогенам и прогестерону (0). Иммунопероксидазный метод. Ок. 10х, об. 20х

коррелирует с использованной нами в предыдущих экспериментах дозой Т4 в 0,1 мг/кг. Концентрация Т4 в 10^{-4} М является гиперконцентрацией гормона и соответствует дозе в 1,0 мг/кг, подобная концентрация гормона встречается при патологиях щитовидной железы, например, при тиреотоксикозе.

При исследовании ингибирования роста клеток различными концентрациями тироксина было установлено, что влияние гормона на пролиферацию опухолевых клеток с наличием рецепторов к эстрогенам и прогестерону незначительно, что не позволяет говорить об активной регуляции этим гормоном процессов деления и роста опухолевых клеток молочной железы подобного фенотипа (табл. 4).

После культивирования клеток рака молочной железы с отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону и получения слоя средней плотности этих клеток в лунки полистиролового планшета вносили Т4 в тех же концентрациях — 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М. Результаты ингибирования роста клеток различными концентрациями Т4 представлены в табл. 4. Как видно из приведенных данных, Т4 при отсутствии рецепторов к эстрогенам и прогестерону на поверхности опухолевых клеток способен значительно ингибировать пролиферацию клеток рака молочной железы. При этом этот гормон проявляет ярко выраженное дозозависимое действие. Влияние Т4 на клетки рака молочной железы в концентрации 10^{-4} и 10^{-8} М приводит к тому, что до половины опухолевых клеток оказываются погибшими (СД рав-

Таблица 4. Степень деструкции слоя клеток рака молочной железы с наличием и отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону при воздействии L-тироксина

Концентрация воздействия L-тироксином, моль	Степень деструкции (СД) слоя клеток рака молочной железы, %	
	с наличием рецепторов к эстрогенам и прогестерону	отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону
10^{-4}	$16,0 \pm 1,62^*$	$43,875 \pm 11,12^*$
10^{-6}	$14,125 \pm 2,26^*$	$26,00 \pm 0,98^*$
10^{-8}	$10,50 \pm 7,34^*$	$50,25 \pm 1,47^*$
контроль	$1,0 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,4$

* $P < 0,05$

няется $43,875\% \pm 11,12$ и $50,25\% \pm 1,47$ соответственно), тогда как в концентрации 10^{-6} М аналогичный эффект проявляется слабее и цитотоксическое действие гормона близко к контролю ($26,0\% \pm 0,98$).

Таким образом, проведенное исследование показало, что воздействие T4 на клетки рака молочной железы способно ингибировать пролиферацию этих клеток, при этом подобная гормональная регуляция процессов деления клеток зависит от степени и формы патологической трансформации раковых клеток. В случае невозможности регуляции пролиферации клеток специфическими гормонами из-за генетических трансформаций, такими как эстрогены и прогестерон, возможен механизм альтернативного регулирования роста и гибели опухолевых клеток, в частности, T4. Также следует отметить дозозависимое влияние T4 на пролиферацию клеток рака молочной железы, при этом эффективная концентрация этого гормона лежит в низких разведениях, что позволяет надеяться на снижение побочных эффектов при его длительном терапевтическом применении.

Как показывают наши исследования и результаты коллег, T4 способен участвовать в регуляции пролиферативной активности опухолевых клеток различной этиологии. В то же время существуют данные об участии T4 в возникновении злокачественных новообразований при нарушении секреции этого гормона щитовидной железой. Так, при заболеваниях молочной железы, в том числе и рака молочной железы, происходят нарушения гормонального статуса женщин, состоящие из изменений секреции стероидных гормонов и снижения экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону, в ос-

нове которого заложена патология щитовидной железы, приводящая к существенному уменьшению выработки Т4 [27].

Т4 способен ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз клеток, несущих на своей мембране к нему рецепторы и способных изменять течение метаболических процессов под его воздействием. Спектр Т4-мишеней довольно широк и в сферу его управления входят не только клетки гормонпродуцирующих органов, например, молочной железы и толстой кишки (АКАТОЛ), но и другие типы клеток, в частности, меланинсодержащие, а Т4-эффекты приводят к перестройке в презентации регуляторных белков на поверхности мембраны клеток, что, в конечном счете, может активизировать процесс апоптотической гибели клеток.

Полученные нами результаты помогают определить альтернативные пути гормональной регуляции пролиферации и апоптоза клеток гормонозависимых опухолей, в частности рака молочной железы, при невозможности регулировать эти процессы традиционными методами. Это помогает понять механизмы активации сигнальной системы клеток рака молочной железы гормонами при наличии изменений в экспрессировании рецепторов на поверхности клеток. Это в свою очередь позволит выработать новую стратегию заместительной терапии гормонозависимых опухолей при низкой эффективности консервативного лечения.

BIOLOGICAL EFFECTS OF THYROID HORMONES

T. S. Saatov, A. A. Abduvaliev

Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent;
e-mail: t.saatov@yandex.ru

The article presents the findings from the study on multifunctional effects of thyroid hormones in relation to normal and malignantly transformed tissues and cells. Both «rapid» and «slow» effects of thyroid hormones including calorogenic effects and effects over adenylate cyclase - cAMP system have been described.

Thyroxin (T4) has been established capable to inhibit proliferation and to induce apoptosis of cells carrying T4 receptors on their membranes as well as to change course of metabolic processes under its effect. Spectrum of T4 targets is quite broad to include not only cells of hormone-producing organs, to name those of the breast and the colon, but also other types of cells to name melanin-containing ones; T4 effects resulting in reconstruction of presentation of regulatory proteins on the cell membrane surface to ultimately activate process of cell apoptosis.

Our findings help determine alternative paths for hormonal regulation of cell proliferation and apoptosis of cells of hormone-dependent tumors, breast cancer, in particular, upon impossibility to regulate the processes by conventional methods. This facilitates understanding mechanisms for activation of signal system of the breast cancer's cells by hormones upon changes in expression of receptors on the cells' surface, making possible development of novel strategy for replacement therapy of hormone-dependent tumors upon low efficacy of drug therapy.

Литература

1. Туракулов Я. Х., Саатов Т. С., Халиков С. К. и др. Циклические нуклеотиды и регуляция клеточного метаболизма. — Из-во «ФАН» УзССР, Ташкент, 1983. — 237 с.
2. Buchanan I., Tapley D. F. // *Endocrinology*. — 1966. — **79**. — P. 81–88.
3. Buchanan I., Tapley D. F. / In: *The Thyroid* (S. C. Werner and S. H. Ingbar, eds), Harper, N.Y., 1971. — P. 90–92.
4. Hoch F. L. // *Physiol. Rev.* — 1962. — **42**. — P. 605.
5. Sokoloff L. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1968. — **60**. — P. 652–661.
6. Tata I. R. IX-th intern. Congress of biochem, Stockholm, 1973.
7. Абдукаримов А. Молекулярно-биохимические механизмы регуляции генетической активности тиреоидными гормонами : автореферат дисс. ... докт. биол. наук. — Ташкент, 1979. — 24 с.
8. Саатов Т. С. Роль липидных компонентов биологических мембран в рецепции гормонов и функционировании аденилатциклазной системы // *Укр. биохим. журн.* — 1981. — № 2. — С. 44–51.
9. Яковлева Н. Н. Характеристика и механизм функционирования рецепторов тиреоидных гормонов на плазматических мембранах : автореферат дисс. ... канд. биол. наук. — Ташкент, 1993. — 20 с.
10. Туракулов Я. Х., Халиков С. К., Далимова С. Н. Участие с АМР в механизме действия тиреоидных гормонов. I Всесоюзный симпозиум «Циклические нуклеотиды». — Красноярск, 1976. — С. 101–102.
11. Кахарова О. У. Липиды и рецепция тиреоидных гормонов на плазматической мембране печени и мозга крыс в онтогенезе : автореферат дисс. ... канд. биол. наук. — Ташкент, 1991. — 18 с.
12. Кахарова О., Гулямова Ф. Я., Яковлева Н. О природе тироксинсвязывающих участков на ПМ., тез. докл. X объединенного симп. биохим. обществ СССР-ГДР «Механизмы регуляции клеточной активности». — Москва, 1989. — С. 36–37.
13. Гулямова Ф. Я., Зайнутдинов Б., Яковлева Н., Кахарова О. Взаимосвязь между фосфолипидным составом плазматических мембран клеток печени и мозга и рецепцией тироксина // Тезы докл. III Всесоюзн. симп. по биохимии липидов. — Москва, 1987. — С. 50.
14. Saatov T. S. Gulatova F. Ya., Kakharova O. Characterization of thyroxine receptor from rat liver and brain plasma membranes in ontogenesis, abstracts 20th FEBS conference. — Budapesht, 1990. — P. 256.

15. Саатов Т. С., Зайнутдинов Б. Р., Мучник С. Е. I Всесоюзный биофизический съезд, тезисы докладов. – Москва, 1982. – 3. – С. 1901.
16. Gharbi C. I., Torresani I. High affinity thyroxine binding to purified rat liver plasma membranes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1979. – 88, N 1. – P. 170–177.
17. Gharbi C. I., Torresani I. Thyroid hormone binding to plasma membrane preparations: studies in different states and tissues // *J. Endocrinol. Invest.* – 1981. – 4. – P. 177–183.
18. Varas S. M., Muoz E. M., Hapon M. B. et al. Hyperthyroidism and production of precocious involution in the mammary glands of lactating rats // *Reproduction.* – 2002. – 124. – P. 691–702.
19. Jorns A., Tiedge M., Lenzen S. Thyroxine induces pancreatic beta cell apoptosis in rats. // *Diabetologia.* – 2002. – 45. – P. 851–855.
20. Funahashi H., Imai T., Tanaka Y. et al. Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumors. n rats. // *Jpn. J. Cancer. Res.* – 1999. – 90. – P. 922–927.
21. Lowe M. N., Plosker G. L. Bexarotene // *Am. J. Clin. Dermatol.* – 2000. – 1(4). – P. 245–250.
22. Petrovici A., Schmid K. W., Faessler A. et al. High spin states in 68As: Experiment and theory // *Phys. Rev. C. Nucl. Phys.* – 1996. – 53(5). – P. 2134–2141.
23. Cordes N., Rödel F., Rodemann H. P. Molecular signaling pathways. Mechanisms and clinical use // *Strahlenther. Onkol.* – 2012. – Suppl 3. – P. 308–311.
24. Агол В. И. Генетически запрограммированная смерть клетки // *Сорос. образов. журн.* – 1996. – № 6. – С. 20–24.
25. Чиссов В. И., Старинский В. В., Ковалев Б. Н. Состояние и перспективы развития онкологической службы в России // *Гормонозависимые опухоли: Материалы IX Всероссийской конференции онкологов.* – С.-Петербург, 2002. – С. 17–21.
26. Пожарисский К. М., Линман Е. Е. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний // *Архив патологии.* – 2000. – № 5. – С. 3–11.
27. Тарутинов В. И., Досенко И. В., Шпилёв С. И. Принципы формирования индивидуальных планов этапного лечения больных раком молочной железы с учетом основных патогенетических форм заболевания / *Метод. рекомендации.* – 2003, Киев. – 18 с.

REACTIVE OXYGEN SPECIES IN SIGNAL TRANSDUCTION

L. B. DROBOT¹, A. A. SAMOYLENKO¹, A. V. VOROTNIKOV²,
P. A. TYURIN-KUZMIN², A. V. BAZALII¹, T. KIETZMANN³,
V. A. TKACHUK², S. V. KOMISARENKO¹

¹*Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: drobot@biochem.kiev.ua*

²*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, Russia;*

³*Department of Biochemistry and Biocenter Oulu,
University of Oulu, Oulu, Finland;*

Reactive oxygen species (ROS) are products of incomplete reduction of oxygen both nonradicals and radicals that function as mediators of redox signaling and oxidative stress depending on their levels in different subcellular compartments. Up to date, a huge body of data are accumulated, which supports a role of ROS as “second messengers” in intracellular signaling cascades that control cell growth, proliferation, apoptosis as well as migration and invasion. The current review summarizes data regarding ROS-dependent regulation of signaling networks components including MAPK, PI3K/Akt, PKC, NF- κ B, Nrf2, FoxO and HIF-1 α , and role of ROS in tumorigenesis.

There is much evidence that ROS affect the major cell signaling cascades [1–3]. Their effect is based primarily on the fact that some ROS can modify the “redox”-sensitive residues in signaling protein molecules. The best studied is the reaction of ROS with cysteine residues, especially in the active sites of enzymes [4]. Accordingly, growth factors, hormones and clotting factors, including platelet-derived growth factor (PDGF), angiotensin II and insulin use ROS, at least in part, as intracellular messengers. Thus, the accumulation of ROS in cells may mimic the effects of these ligands and lead to ligand-independent modulation of many signaling cascades.

Often ROS-dependent signaling involves MAPKs (mitogen-activated protein kinases) and/or PI3K (phosphatidylinositol-3-kinases)/Akt. In addition, the activity of other protein kinases, including protein kinase C (PKC), JNK (Janus kinase) and ATM (ataxia-telangiectasia mutated), may be modulated by the action of ROS [3, 5–7]. Other important targets of ROS are protein tyrosine phosphatases (PTP). Catalytic oxidation of cysteine residues in the molecules of PTPs leads to their reversible inactivation [8]. Both ligand-independent changes in intracellular redox state and increased formation of ROS when exposed to extracellular stimuli can cause oxidation of PTPs. Not only classical PTPs that dephosphorylate specific phosphotyrosine or phosphoserine/phosphothreonine residues, but

also dual specificity phosphatases able to dephosphorylate phospholipids, may be targets of ROS-dependent oxidation [8]. Some adapter proteins also undergo regulation by the action of ROS. Specifically, p66(Shc) protein that is involved in signal transduction from membrane receptors to activated Ras, can be phosphorylated at serine residues under oxidative stress. Accordingly, the cells that do not express p66(Shc) are more resistant to apoptosis induced by H₂O₂ [9].

Moreover, it is known that a number of transcription factors can have positive or negative effects on gene expression upon direct or indirect action of ROS. Among such ROS-sensitive transcription factors are NF- κ B (nuclear factor kappa B), Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor-2), SP1, Ref-1 (redox factor-1), cJun, HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) and HIF-2 α [10–12]. Moreover, a number of tumor suppressors such as p53, FoxO (forkhead box O), RB (retinoblastoma protein), p21, p16, BRCA1 and BRCA2 (breast cancer susceptibility genes 1 and 2), play a role in activating the expression of genes encoding antioxidant enzymes, including MnSOD and catalase, in response to oxidative stress [3].

Among various signaling pathways and transcription factors that are regulated by the action of ROS, MAPK, PI3K/Akt, PKC, NF- κ B, Nrf2, FoxO and HIF-1 α are among the best studied and will be covered in more detail in our review.

MAPK signaling pathways

MAPK kinases are involved in the regulation of expression of genes responsible for cell proliferation, motility, substrate-independent growth, differentiation and apoptosis. The three main groups of MAPK, such as ERK-1/2 (extracellular signal-regulated kinases), JNK1/2/3 (c-Jun NH2-terminal kinase) and p38 (p38 α / β / γ / δ), are best described. Although the detailed mechanisms are not fully known, ROS can initiate the activation of ERK and JNK cascades, causing autophosphorylation of growth factors receptors, such as EGFR (epidermal growth factor receptor) and PDGFR, in a ligand-dependent manner [13]. Furthermore, it was shown that the various components of the major MAPK signaling cascades can respond to changes in intracellular levels of ROS. In particular, the direct activation of ERK1/2 cascade can be achieved by oxidative modification of Ras at cysteine residue 118 [14]. This modification inhibits GDP/GTP exchange, thereby activating Ras. In addition, ROS also have an indirect effect on the activation of ERK1/2. For example, it influences the activity of MEK1/2 kinase, which phosphorylates ERK1/2. It was also shown that ROS can promote proteasomal degradation of ERK1/2 negative regulator phosphatase MKP3 (mitogen-activated protein kinase phosphatase), thereby activating ERK1/2 [15].

In addition, oxidative stress can activate JNK1-3 [16]. JNKs were first discovered by the ability to bind and phosphorylate protein c-Jun, which is a component of the transcription complex AP-1 (activator protein-1). ROS can regulate AP-1 via several mechanisms. Experiments *in vitro* have shown that cysteine residues 154 in c-Fos and cysteine 272 in c-Jun are sensitive to ROS-dependent oxidation. Both proteins can be inactivated by oxidation of these cysteines [17]. Furthermore, it was shown that nuclear protein Ref-1 promotes DNA-binding activity of AP-1 through a redox modification of cysteine residues in the DNA-binding domains of Fos and Jun [18]. Redox regulation of AP-1 via JNK cascade can also be achieved with the participation of Trx (thioredoxins). In particular, Trx is a binding partner of ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), which activates JNK and p38 pathways [19]. ROS violate the stability of the complex ASK1-Trx by oxidation and activation of ASK1 [20], followed by activation of JNK and p38. Thus, AP-1 is a transcription factor that may be modified either directly in redox-dependent reactions, or indirectly through upstream redox-sensitive components of signaling pathways.

Beside c-Jun, more than 50 other substrates of JNK were identified. Activated JNK is associated in particular with the regulation of cell death, since antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-XL and Bad can be phosphorylated by the action of JNK [21, 22]. When JNK phosphorylates Bcl-2 or Bcl-XL, this leads to inhibition of their activity and loss of antiapoptotic functions. Activated JNK, in addition to inhibition of Bcl-2, also increases the levels of proapoptotic protein Bax [23]. As a result, the ratio of Bax/Bcl-2 changes in favor of Bax, then the outer mitochondrial membrane becomes more permeable leading to cytochrome c release, caspase cascade activation and induction of apoptosis. Simultaneously, the mitochondrial superoxide is released into the cytosol, where it turns into H₂O₂ by the action of Cu/Zn SOD. It was recently shown that these ROS cause translocation of serine/threonine protein kinase D1 (PKD1) from the Golgi complex into mitochondria. PKD1, in turn, can inhibit JNK and activate antiapoptotic effects of transcription factor NF-κB and induce expression of antioxidant enzymes [24].

Another important inducer of JNK activity either by direct interaction or by oxidation-sensitive mechanism is HNE (4-hydroxy-2-nonenal), a stable product of lipid peroxidation [25, 26]. HNA-induced activation of JNK is H₂O₂-dependent in rat liver RL34 cells. Moreover, HNA forms adducts with JNK, leading to nuclear translocation and activation of this kinase in hepatic stellate cells [25, 26].

The p38 kinases have been first identified as modulators of TNF (tumor necrosis factor) signaling [27]. Later it was found that activation of p38 MAPKs occurs by the action of many other stimuli, including hormones,

oxidative stress, osmotic and heat shock, which are often accompanied by the formation of H_2O_2 . At least four representatives of p38 kinase family (α , β , γ and δ) are identified. Among them the enzyme p38 α is best characterized. It was shown that H_2O_2 activates p38 pathway in various cell types [28]. On the other hand, a recent study showed that H_2O_2 can inhibit the activity of p38, despite the increased phosphorylation of the kinase. It was demonstrated that in response to H_2O_2 and prostaglandin J2 treatment cysteine residues 119 and 162 near the surface of the p38 molecule are oxidized [29].

PI3K/Akt signaling pathway

Protein kinase B (PKB), also known as Akt because of its homology with the oncogene v-Akt, is a serine/threonine kinase that plays a key role in many cellular processes and is often overexpressed in different types of tumors. Non-physiological activation of Akt leads to increased angiogenesis, metastasis, insensitivity to the action of growth factors and inhibition of apoptosis in tumor cells [30]. Three isoforms of Akt, PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 and PKB γ /Akt3, were described. The isoform PKB α is predominant in most cell types. Akt, which is activated by the action of PI3K, regulates, directly or indirectly, the activity of many transcription factors such as CREB (cAMP response element-binding) or FoxO [30, 31].

ROS, such as H_2O_2 , can activate Akt in various cell types, including NIH 3T3, HEK293, HeLa and Jurkat cells [32]. Under conditions of oxidative stress activation of Akt can be achieved either directly or indirectly through participation of other kinases. It is known that H_2O_2 can stimulate the activity of MAPKAP kinase-2, p38 substrate, able to phosphorylate PKB/Akt *in vitro* [33]. Biologically significant concentrations of ROS activate growth factor receptors, including EGFR and PDGFR, which causes stimulation of PKB/Akt signaling pathway [34]. It was also shown that ROS can initiate PKB/Akt phosphorylation through stimulation of cytosolic tyrosine kinase FAK (focal adhesion kinase), which leads to activation of PI3K [34].

The tumor suppressor PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) is an important inhibitor of PI3K. Inactivation of PTEN increases the activation of PKB/Akt, and indeed, it was found that ROS may inactivate PTEN through oxidation of cysteine residue 124 [35]. Loss of PTEN leads to further enhancement of oxidative stress by depletion of intracellular peroxiredoxins (Prxs) and Cu/Zn SOD [36].

PKC signaling pathway

The protein kinase C (PKC) family consists of a number of isoforms containing regulatory and catalytic domains, respectively, in the amino-

and carboxy-terminal parts of their molecules. PKC isoforms are divided into three subgroups, cPKC (conventional), nPKC (novel), and aPKC (alternative), based on the structural characteristics of their regulatory domains [37]. PKC isoforms that regulate a wide range of cellular processes, including proliferation, differentiation and apoptosis, are involved in the development of various forms of cancer. Several agonists and antagonists of PKC are examined as potential anticancer agents [37].

The activity of some PKC isoforms is modulated by the action of ROS. For example, isoforms α , β I and γ of cPKC, δ and ε of nPKC and ζ of aPKC are activated after the addition of H_2O_2 to the cells [38]. Most probably, conservative cysteine-rich regions of PKC α , which may be sensitive to ROS and are responsible for binding of diacylglycerol, are also involved in the activation of PKC [39].

Transcription factor NF- κ B

Members of the NF- κ B transcription factor family are homodimers or heterodimers formed by several related proteins such as p50, p52, RelA (p65), Rel B and c-Rel. They all contain a domain homologous to Rel, which mediates dimerization, specific DNA recognition and interaction with inhibitory subunit (I κ B). Isoforms of I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B γ (p105), I κ B δ (p100), I κ B ε and BCL-3 [40] prevent nuclear translocation of NF- κ B homo- and heterodimers. In general, NF- κ B is activated and transported into the nucleus after degradation of I κ B subunit as a result of phosphorylation and ubiquitylation [40]. There are two main pathways that activate NF- κ B, canonical and non-canonical, the first being stimulated by pro-inflammatory receptors (TNF receptor family, TLR (Toll-like receptors) and cytokine receptors), and the second activated by those members of TNF family receptors that bind TRAF (TNF receptor associated factor) proteins [41]. The NF- κ B transcription factors are involved in regulating the expression of hundreds of genes related to immune response, cell growth, differentiation, and apoptosis [42]. Therefore, as expected, constitutive activation of NF- κ B is found in various forms of cancer [43].

Activation of NF- κ B is often associated with the formation of ROS, since a number of stimuli that activate NF- κ B can also cause ROS formation. It has been shown that ROS are mediators in the phosphorylation of I κ B α -specific kinases IKK α and IKK β , resulting in the release of NF- κ B dimers, which further are translocated to the nucleus [44]. In addition, protein kinase Tak1, which activates IKK by phosphorylation, is redox-sensitive [41]. As another example, TNF α initiates a redox-dependent phosphorylation of serine 276 residue in the RelA molecule. Later it was found that phosphorylation of this residue, required for activation of NF- κ B, can be mediated by the catalytic subunit of PKA, whose activity is regulated

by the ROS action [45]. It is also known that NF- κ B can be activated by the action of PKC and MAPK [46, 47], which, as described above, are regulated by ROS. Unlike other effects of ROS leading to activation of NF- κ B, it was shown that oxidation of cysteine residue 62 in the p50, another member of NF- κ B family, reduces its ability to bind DNA [48–50]. In addition, there is evidence that the impact of ROS on the activity of NF- κ B may depend on intracellular compartment: ROS stimulate NF- κ B in the cytoplasm, but inhibit its activity in the nucleus [51].

NF- κ B regulates the expression of many genes that encode antioxidant enzymes, e.g. SOD, GPX1, Trx-1, Trx-2, HO-1 and ferritin heavy chain. Playing an important role in inflammation, NF- κ B, on the other hand, controls the expression of a number of “prooxidant” genes such as NOX2, XOR (xanthine oxidoreductase), inducible NO-synthase, cyclooxygenase-2 and lipooxygenase [41]. Thus, activation of NF- κ B can differentially regulate the redox state of the cell, depending on the stimulus.

Transcription factor FoxO

Transcription factors of FoxO (forkhead box O) family belong to a large group of proteins, which are characterized by conservative Fox (forkhead box) DNA-binding domain [52]. The FoxO family in mammals includes four proteins, FoxO1, Foxo3a, FoxO4 and FoxO6, the expression of which varies depending on the tissue type. FoxO proteins play a key role in many cellular processes, including proliferation, differentiation, apoptosis, DNA damage and resistance to stress [3].

The activity of FoxO transcription factors, which is largely controlled by insulin/PI3K/Akt signaling cascade, may be regulated by the action of ROS at different levels. It has been shown that ROS affect the transcriptional activity of FoxO, influencing a number of post-translational modifications, such as phosphorylation, acetylation and ubiquitylation [53]. ROS can as well influence the activity of FoxO indirectly by activation of Akt, ERK, JNK, p38 and IKK depending on the cell type, duration and intensity of the accumulation of ROS [3]. Recently, it was found that ROS also cause oxidation of cysteine residues in FoxO, thereby directly affecting the activity of this transcription factor [54]. Activation of FoxO upon ROS action can cause cell cycle arrest and removal of ROS through activation of antioxidant enzymes, including MnSOD and catalase [3].

Transcription factor Nrf2

Another target of ROS is bZIP Cap'n'Collar transcription factor Nrf2, which can integrate a variety of cellular responses to oxidative stress. Under normal conditions, Nrf2 forms an inactive complex in the cytoplasm with the cytoskeletal protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)

leading to ubiquitylation and proteasomal degradation of Nrf2 [55]. Under conditions of oxidative stress kinase PERK (double stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase) is activated, which causes phosphorylation of Nrf2, dissociation of the Nrf2-Keap1 complex and transport of Nrf2 to the nucleus [56]. After heterodimerization with other transcription factors, Nrf2 activates the transcription of genes that contain ARE (antioxidant response elements) [57]. ARE regulates the expression of genes involved in antioxidant defense, such as genes for glutathione S-transferase (GST) A1 and A2, γ -glutamylcysteine synthetase, heme oxygenase-1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase and UDP-glucuronosyl transferase [57].

Moreover, ROS can also act at the level of Keap1. The ability of Nrf2 to bind Keap1 is regulated via critical cysteine residues 151, 273 and 288, which are essential for Keap1-dependent ubiquitylation and proteasomal degradation [58]. Thus, there are two mechanisms of Nrf2 activation: Direct phosphorylation of Nrf2 by PERK, PKC, MAPK and PI3K [59] and modification of cysteine residues in Keap1, which prevents proteasomal degradation of Nrf2 [58].

Transcription factors HIF α

Transcription factor HIF is a dimer composed of α -subunit and β -subunit, also known as ARNT (arylhydrocarbon receptor-nuclear translocator). Both subunits belong to the family of transcription factors bHLH-PAS, containing domains bHLH (basic helix - loop - helix) and PAS (Per-ARNT-Sim). Among three different α -subunits of HIF, known to date, HIF-1 α and HIF-2 α are key regulators of the expression of physiologically important genes induced by hypoxia. The processes regulated by the action of HIF include glucose metabolism, erythropoiesis, angiogenesis, cell survival and proliferation. Despite the fact that HIF-2 α 's structure is similar to that of HIF-1 α , the functions of HIF-2 α and HIF-1 α vary depending on the cell type [60]. In contrast, HIF-3 α is not an effective stimulator of gene expression by hypoxia and may even act as a repressor [61, 62].

Intracellular amount of HIF-1 is controlled mainly at the post-translational level by regulating the stability of the α -subunit of the protein. The stability of α -subunits and their activity is dependent on hydroxylation of, respectively, proline and asparagine residues. At normal intracellular oxygen concentrations two proline residues (402 and 564) of HIF-1 α subunit are hydroxylated by specific prolyl hydroxylases PHD1-4 (prolyl hydroxylase domain) [63–65]. Hydroxylation enables protein VHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein), which is a component of the E3 ubiquitin-ligase complex, to bind HIF-1 α and stimulate its ubiquitylation and further proteasomal degradation [66, 67]. In addition, asparaginyl hydroxylase FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) under normoxia catalyze hy-

droxylation of asparagine residues in the α -subunit of HIF, which prevents them from binding transcription activator CBP (cAMP-response element-binding protein)/p300 [68]. Since hydroxylation reaction is oxygen-dependent, it does not occur under hypoxia. After HIF-1 α escapes degradation in the proteasome and recruits CBP/p300, it accumulates, translocates to the nucleus and forms there a complex with HIF-1 β [69]. The resulting heterodimer binds to promoter HRE (hypoxia response element) sequences and induces expression of the corresponding genes.

It is known that the addition of H₂O₂ to the cells that grow under conditions of hypoxia leads to destabilization of HIF-1 α [70] and HIF-2 α [71]. These data fit well into the concept of the important role of ROS in HIF-dependent signaling. Both direct and indirect redox-dependent processes that regulate intracellular content of HIF-1 and HIF-2 were described. The target of direct ROS-dependent regulation is the C-terminal domain of HIF, in which cysteine residues 800 (for HIF-1) and 848 (for HIF-2) are necessary for transactivation [72]. Oxidation/reduction of these cysteine residues depends on the activity of redox-dependent factor Ref-1 [73]. In addition to the Ref-1, other coactivators, including SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) and TIF2 (transcription intermediary factor 2), interact with the C-terminal domain of HIF-1 and HIF-2 in ROS-dependent manner [73]. Indirect regulation of HIF-1 upon ROS action is mainly due to the changes in the activity of PHD and redox-sensitive kinases and phosphatases [74].

The PI3K/Akt and MAPK cascades, that are dependent on the action of ROS (see above), can also affect HIF α levels [75]. Accordingly, antioxidants and inhibitors of NADPH oxidase prevent PI3K/Akt-dependent HIF-1 α activation [76]. In addition, ERK1/2 can phosphorylate HIF-1 α [75] and contribute to induction of HIF-1 upon the action of multiple stimuli that increase the formation of ROS, such as angiotensin II [77], prostaglandin E2 [78] and shock waves [79]. However, it should be remembered that the sensitivity of ERK1/2 to ROS and subsequent induction of HIF-1 α depends on the cell type and stimulus [76, 79]. The components of p38 kinase signaling pathway, such as MKK3 and MKK6 [80], are also involved in the induction of HIF-1 α upon the action of thrombin [76] and chromium (VI) [81]. Finally, phosphatases such as MKP-1 and MKP-3 and protein phosphatase-2 may be regulated by the action of ROS and affect the activity/stability of HIF-1 α [82, 83].

The dual role of ROS in the carcinogenesis

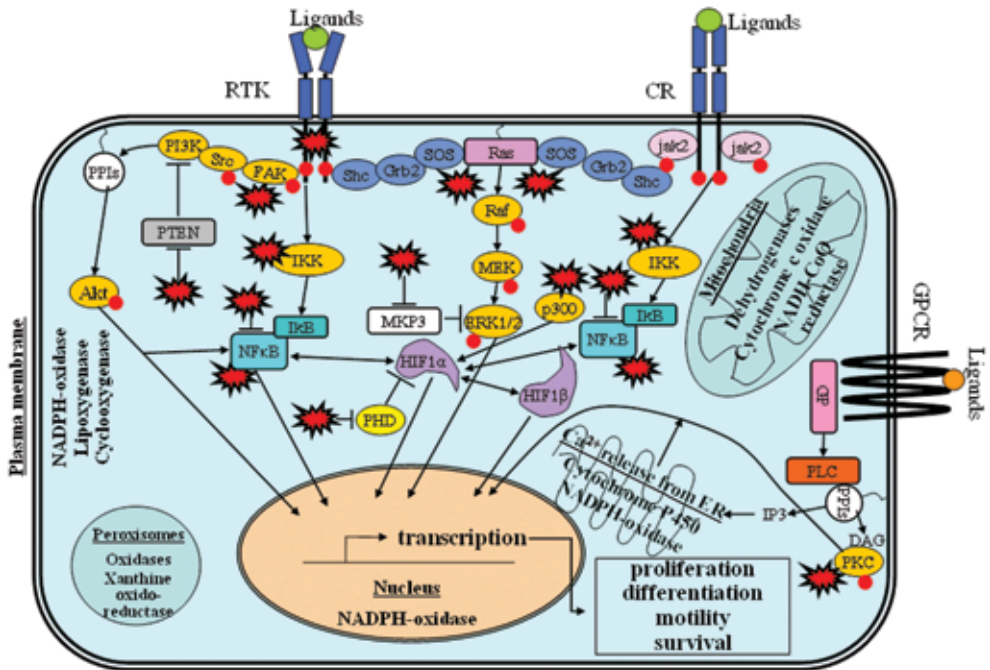
In general, the mechanisms of ROS-dependent regulation of key intracellular signaling pathways are complex and require further study. The role of each of these pathways in the process of carcinogenesis can be very

complex [84–86]. In short, depending on the kinetics of activation and inactivation, intracellular localization, the formation of complexes with protein partners, as well as the presence of substrates, these pathways have a significant impact on cell cycle, apoptosis, survival, angiogenesis, invasion and metastasis [87].

Although ROS, when accumulated above physiological levels, are not always harmful to the cell, it happens in many cases due to mutations of oncogenes and tumor suppressor genes, and also because of the induction of signaling pathways responsible for carcinogenesis. However, the overall picture of the ROS role in the process of malignant transformation of cells is rather complex. While a moderate increase in ROS levels induces tumor growth, excessively high levels of ROS can inhibit carcinogenesis [88]. Several studies have demonstrated the ability of ROS to induce apoptosis in cancer cells, and also found that high levels of ROS correlated with decreased proliferation of transformed cells, decreased angiogenesis and metastasis [87]. One of the possible ways to inhibit cell proliferation when exposed to elevated concentrations of ROS is p16-dependent activation of PKC δ [89, 90]. In addition, various types of ROS can sometimes reveal the opposite effect. For example, O₂⁻ and H₂O₂ inhibit the invasion and migration of human lung carcinoma H460 cells, whereas \cdot OH increases the migratory and invasive properties of the cells of this type [91].

The “threshold concept” in the treatment of cancer suggests that it is possible to achieve a specific accumulation of ROS in cancer cells to the levels that trigger cell death [88, 92]. In accordance with this concept, a recent study showed that alkaloid piperlongumine increases the levels of ROS and apoptosis in cancer cells, but has little effect on untransformed cells, regardless of their proliferation rates [93]. Therapeutic strategies based on the use of ROS both as inducers and inhibitors of carcinogenesis have been developed [86, 94, 87]. For example, the drug procarbazine in aqueous solutions undergoes oxidation, which enhances the production of H₂O₂ to concentrations that are cytotoxic [95]. Now procarbazine is allowed for the treatment of lymphomas and melanomas [87]. Another chemotherapeutic agent, which enhances the production of O₂⁻ in cancer cells, is As₂O₃ [96]. Like many chemotherapeutic drugs, radiation therapy stimulates the formation of ROS, thus eliminating cancer cells from the body [97].

Since many anti-cancer agents act by inducing ROS, antioxidants, reducing levels of ROS, can also promote tumor growth. In particular, it was found that antioxidants improve the survival of cells that have lost the ability to attach to the extracellular matrix [98]. Accordingly, some chemotherapeutic agents do not induce ROS formation but inhibit the action of antioxidants. In particular, As₂O₃ irreversibly inhibits thioredoxin reductase



Major intracellular signaling pathways that are regulated by ROS action either positively or negatively. PI3K/Akt, Ras/ERK, PLC, NF-κB and HIF-1 signaling pathways are presented in a simplified manner. The main physiological sources of ROS in plasma membrane and various intracellular compartments are also indicated. ROS are shown as big star polygons. Phosphogroups are shown as small red circles. The single-head arrows indicate activation, the double-head arrows indicate interaction, and the blunt-end arrows indicate inhibition.

CR, cytokine receptors; DAG, diacylglycerol; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FAK, focal adhesion kinase; GP, G-protein; GPCR, G-protein coupled receptor; Grb2, growth factor receptor-bound protein 2; HIF-1, hypoxia-inducible factor-1; IκB, inhibitor of NF-κB; IKK, IκB kinase; IP3, inositol trisphosphate; Jak2, Janus kinase 2; MEK, MAPK/ERK kinase; MKP3, mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase/dual specificity protein phosphatase-6; NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PHD, prolyl hydroxylase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PI3P, phosphatidylinositol 3-phosphate; PKB/Akt, protein kinase B; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; PPI, polyphosphoinositide; PTEN, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; Raf, ras attachment factor; Ras, Rat sarcoma; RTK, receptor tyrosine kinase; SOS, son of sevenless, guanine nucleotide exchange factor; Shc, SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein; Src, from sarcoma, cytoplasmic tyrosine kinase

(TrxR) in mammals [99]. The inhibitors of SOD are also potential chemotherapeutic agents [87].

On the other hand, there are antitumor drugs that inhibit the production of ROS. For instance, minodronate and histamine dihydrochloride reduce ROS by regulating the activity of NOX [100, 101]. It is believed that minodronate inhibits the growth of melanoma cells by preventing Ras stimulation, which is ROS mediated [101].

In general, protective or, conversely, carcinogenic effects of ROS depend on the stage of tumorigenesis. For example, since many smokers or people who are constantly exposed to carcinogens (e.g., asbestos workers) may suffer from subclinical cancer, inhibition of ROS levels in cancer cells of these individuals can be harmful. Indeed, studies on the role of low molecular weight antioxidants found that some dietary antioxidant supplements increased cancer incidence and/or mortality in smokers. In particular, increased use of antioxidant β -carotene has been associated with higher mortality from lung cancer in smokers [102].

This work was partially supported by bilateral grant between National Academy of Sciences (NAS) of Ukraine and Russian Fund for Basic Research (RFBR) – 2012.

References

1. *Martindale J. L., Holbrook N. J.* // *J. Cell Physiol.* – 2002. – **192**, N 1. – P. 1–15.
2. *Morgan M. J., Liu Z. G.* // *Cell Res.* – 2011. – **21**. – P. 103–115.
3. *Vurusaner B., Poli G., Basaga H.* // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – **52**. – P. 7–18.
4. *Paulsen C. E., Carroll K. S.* // *ACS Chem. Biol.* – 2010. – **5**, N 1. – P. 47–62.
5. *Comba A., Lin Y. H., Eynard A. R. et al.* // *Cancer Metastasis Rev.* – 2011. – **30**. – P. 325–342.
6. *Lauth M.* // *Front. Biosci.* – 2011. – **17**. – P. 2259–2270.
7. *Yao H., Ashihara E., Maekawa T.* // *Expert Opin. Ther. Targets.* – 2011. – **15**. – P. 873–887.
8. *Ostman A., Frijhoff J., Sandin A., Bohmer F. D.* // *J. Biochem.* – 2011. – **150**. – P. 345–356.
9. *Migliaccio E., Giorgio M., Mele S. et al.* // *Nature.* – 1999. – **402**, N 6759. – P. 309–313.
10. *Lavrovsky Y., Chatterjee B., Clark R. A., Roy A. K.* // *Exp. Gerontol.* – 2000. – **35**. – P. 521–532.
11. *Speciale A., Chirafisi J., Saija A., Cimino F.* // *Curr. Mol. Med.* – 2011. – **11**. – P. 770–789.
12. *Diebold I., Flugel D., Becht S. et al.* // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2010. – **13**. – P. 425–436.
13. *Knebel A., Rahmsdorf H. J., Ullrich A., Herrlich P.* // *EMBO J.* – 1996. – **15**. – P. 5314–5325.

14. Lander H. M., Hajjar D. P., Hempstead B. L. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**. – P. 323–4326.
15. Chan D. W., Liu V. W., Tsao G. S. et al. // *Carcinogenesis*. – 2008. – **29**. – P. 1742–1750.
16. McCubrey J. A., Lahair M. M., Franklin R. A. // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2006. – **8**, N 9–10. – P. 1775–1789.
17. Handel M. L., Watts C. K., deFazio A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – **92**, N 10. – P. 4497–4501.
18. Diamond D. A., Parsian A., Hunt C. R. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**, N 24. – P. 16959–16964.
19. Saitoh M., Nishitoh H., Fujii M. et al. // *EMBO J.* – 1998. – **17**, N 9. – P. 2596–2606.
20. Katagiri K., Matsuzawa A., Ichijo H. // *Methods. Enzymol.* – 2010. – **474**. – P. 277–288.
21. Jin H. O., Seo S. K., Woo S. H. et al. // *Lung Cancer*. – 2008. – **61**, N 3. – P. 317–327.
22. Wang X. T., Pei D. S., Xu J. et al. // *Cell Signal.* – 2007. – **19**, N 9. – P. 1844–1856.
23. Liou G. Y., Storz P. // *Free Radic. Res.* – 2010. – **44**, N 5. – P. 479–496.
24. Pham C. G., Papa S., Bubici C. et al. // *Curr. Med. Chem. Anti Inflamm. Anti Allergy Agents.* – 2005. – **4**, N 6. – P. 569–576.
25. Parola M., Robino G., Marra F. et al. // *J. Clin. Invest.* – 1998. – **102**, N 11. – P. 1942–1950.
26. Uchida K., Shiraishi M., Naito Y. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – **274**, N 4. – P. 2234–2242.
27. Beyaert R., Cuenda A., Vanden Berghe W. et al. // *EMBO J.* – 1996. – **15**, N 8. – P. 1914–1923.
28. Matsukawa J., Matsuzawa A., Takeda K., Ichijo H. // *J. Biochem.* – 2004. – **136**, N 3. – P. 261–265.
29. Templeton D. J., Aye M. S., Rady J. et al. // *PLoS One.* – 2010. – **5**, N 11. – e15012.
30. Fresno Vara J. A., Casado E., de Castro J. et al. // *Cancer Treat. Rev.* – 2004. – **30**, N 2. – P. 193–204.
31. Nicholson K. M., Anderson N. G. // *Cell Signal.* – 2002. – **14**, N 5. – P. 381–395.
32. Mehdi M. Z., Azar Z. M., Srivastava A. K. // *Cell Biochem. Biophys.* – 2007. – **47**, N 1. – P. 1–10.
33. Shaw M., Cohen P., Alessi D. R. // *Biochem. J.* – 1998. – **336**, Pt 1. – P. 241–246.
34. Wang X., McCullough K. D., Franke T. F., Holbrook N. J. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**, N 19. – P. 14624–14631.
35. Lee S. R., Yang K. S., Kwon J. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 23. – P. 20336–20342.
36. Huo Y. Y., Li G., Duan R. F. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – **44**, N 8. – P. 1578–1591.

37. Redig A. J., Plataniias L. C. // *Leuk. Lymphoma.* – 2008. – **49**, N 7. – P. 1255–1262.
38. Konishi H., Tanaka M., Takemura Y. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – **94**, N 21. – P. 11233–11237.
39. Kazanietz M. G. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – **1754**, N 1–2. – P. 296–304.
40. Ferreira D. U., Komives E. A. // *Biochemistry.* – 2010. – **49**, N 8. – P. 1560–1567.
41. Morgan M. J., Liu Z. G. // *Cell Res.* – 2011. – **21**, N 1. – P. 103–115.
42. Klaunig J. E., Kamendulis L. M. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2004. – **44**. – P. 239–267.
43. Rayet B., Gélinas C. // *Oncogene.* – 1999. – **18**, N 49. – P. 6938–6947.
44. Kamata H., Manabe T., Oka Si. et al. // *FEBS Lett.* – 2002. – **519**, N 1–3. – P.231–237.
45. Jamaluddin M., Wang S., Boldogh I. et al. // *Cell Signal.* – 2007. – **19**, N 7. – P. 1419–1433.
46. Ventura C., Maioli M. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 2001. – **11**, N 1–3. – P. 243–267.
47. Razin E., Szallasi Z., Kazanietz M. G. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – **91**, N 16. – P. 7722–7726.
48. Matthews J. R., Kaszubska W., Turcatti G. et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – **21**, N 8. – P. 1727–1734.
49. Matthews J. R., Wakasugi N., Virelizier J. L. et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – **20**, N 15. – P. 3821–3830.
50. Pineda-Molina E., Klatt P., Vázquez J. et al. // *Biochemistry.* – 2001. – **40**, N 47. – P. 14134–14142.
51. Kabe Y., Ando K., Hirao S. et al. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2005. – **7**, N 3–4. – P. 395–403.
52. Kaestner K. H., Knochel W., Martinez D. E. // *Genes Dev.* – 2000. – **14**, N 2. – P. 142–146.
53. Dansen T. B. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – **14**, N 4. – P. 559–561.
54. Dansen T. B., Smits L. M., van Triest M. H. et al. // *Nat. Chem. Biol.* – 2009. – **5**, N 9. – P. 664–672.
55. Taguchi K., Motohashi H., Yamamoto M. // *Genes Cells.* – 2011. – **16**, N 2. – P. 123–140.
56. Cullinan S. B., Zhang D., Hannink M. et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2003. – **23**, N 20. – P. 7198–7209.
57. Zhao C. R., Gao Z. H., Qu X. J. // *Cancer Epidemiol.* – 2010. – **34**, N 5. – P. 523–533.
58. Yamamoto T., Suzuki T., Kobayashi A. et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2008. – **28**, N 8. – P. 2758–2770.
59. Keum Y. S., Jeong W. S., Kong A. N. // *Mutat. Res.* – 2004. – **555**, N 1–2. – P. 191–202.
60. Hu C. J., Wang L. Y., Chodosh L. A. et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2003. – **23**, N 24. – P. 9361–9374.

61. *Hara S., Hamada J., Kobayashi C. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – **287**, N 4. – P. 808–813.
62. *Heikkilä M., Pasanen A., Kivirikko K. I., Myllyharju J.* // *Cell Mol. Life Sci.* – 2011. – **68**, N 23. – P. 3885–3901.
63. *Semenza G. L.* // *Exp. Physiol.* – 2006. – **91**, N 5. – P. 803–806.
64. *Epstein A. C., Gleadle J. M., McNeill L. A. et al.* // *Cell.* – 2001. – **107**, N 1. – P. 43–54.
65. *Bruick R. K., McKnight S. L.* // *Science.* – 2001. – **294**, N 5545. – P. 1337–1340.
66. *Jaakkola P., Mole D. R., Tian Y. M. et al.* // *Science.* – 2001. – **292**, N 5516. – P. 468–472.
67. *Ivan M., Kondo K., Yang H. et al.* // *Science.* – 2001. – **292**, N 5516. – P. 464–468.
68. *Lando D., Peet D. J., Whelan D. A. et al.* // *Science.* – 2002. – **295**, N 5556. – P. 858–861.
69. *Kallio P.J., Okamoto K., O'Brien S. et al.* // *EMBO J.* – 1998. – **17**, N 22. – P. 6573–6586.
70. *Wang G. L., Jiang B. H., Semenza G. L.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – **216**, N 2. – P. 669–675.
71. *Chen H., Shi H.* // *FEBS Lett.* – 2008. – **582**, N 28. – P. 3899–3902.
72. *Kietzmann T., Görlach A.* // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2005. – **16**, N 4–5. – P. 474–486.
73. *Carrero P., Okamoto K., Coumailleau P. et al.* // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – **20**, N 1. – P. 402–415.
74. *Jokilehto T., Jaakkola P. M.* // *J. Cell Mol. Med.* – 2010. – **14**, N 4. – P. 758–770.
75. *Dimova E. Y., Michiels C., Kietzmann T.* // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – **15**, N 33. – P. 3867–3877.
76. *Görlach A., Diebold I., Schini-Kerth V. B. et al.* // *Circ. Res.* – 2001. – **89**, N 1. – P. 47–54.
77. *Richard D. E., Berra E., Pouyssegur J.* // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**, N 35. – P. 26765–26771.
78. *Fukuda R., Kelly B., Semenza G. L.* // *Cancer Res.* – 2003. – **63**, N 9. – P. 2330–2334.
79. *Wang F. S., Wang C. J., Chen Y. J. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 11. – P. 10331–10337.
80. *Kietzmann T., Jungermann K., Görlach A.* // *Thromb. Haemost.* – 2003. – **89**, N 4. – P. 666–673.
81. *Gao N., Jiang B. H., Leonard S. S. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 47. – P. 45041–45048.
82. *Liu C., Shi Y., Han Z. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – **312**, N 3. – P. 780–786.
83. *Marchetti S., Gimond C., Roux D. et al.* // *J. Cell. Physiol.* – 2004. – **199**, N 3. – P. 441–450.
84. *Carnero A.* // *Curr. Pharm. Des.* – 2010. – **16**, N 1. – P. 34–44.

85. *Raman M., Chen W., Cobb M. H. // Oncogene. – 2007. – 26, N 22. – P. 3100–3112.*
86. *Ray P. D., Huang B. W., Tsuji Y. // Cell Signal. – 2012. – 24, N 5. – P. 981–990.*
87. *Gupta S. C., Hevia D., Patchva S. et al. // Antioxid. Redox Signal. – 2012. – 16, N 11. – P. 1295–1322.*
88. *Kong Q., Beel J. A., Lillehei K. O. // Med. Hypotheses. – 2000. – 55, N 1. – P. 29–35.*
89. *Ramsey M. R., Sharpless N. E. // Nat. Cell Biol. – 2006. – 8, N 11. – P. 1213–1215.*
90. *Takahashi A., Ohtani N., Yamakoshi K. et al. // Nat. Cell Biol. – 2006. – 8, N 11. – P. 1291–1297.*
91. *Luanpitpong S., Talbott S. J., Rojanasakul Y. et al. // J. Biol. Chem. – 2010. – 285, N 50. – P. 38832–38840.*
92. *Pelicano H., Carney D., Huang P. // Drug Resist. Updat. – 2004. – 7, N 2. – P. 97–110.*
93. *Raj L., Ide T., Gurkar A. U. et al. // Nature. – 2011. – 475, N 7355. – P. 231–234.*
94. *Trachootham D., Alexandre J., Huang P. // Nat. Rev. Drug Discov. – 2009. – 8, N 7. – P. 579–591.*
95. *Berneis K., Bollag W., Kofler M., Lüthy H. // Eur. J. Cancer. – 2004. – 40, N 13. – P. 1928–1933.*
96. *Pelicano H., Feng L., Zhou Y. et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – 278, N 39. – P. 37832–37839.*
97. *Azzam E. I., de Toledo S.M., Little J. B. // Curr. Cancer Drug Targets. – 2004. – 4, N 1. – P. 53–64.*
98. *Schafer Z. T., Grassian A. R., Song L. et al. // Nature. – 2009. – 461, N 7260. – P. 109–113.*
99. *Lu J., Chew E. H., Holmgren A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – 104, N 30. – P. 12288–12293.*
100. *Agarwala S.S., Glaspy J., O’Day S. J. et al. // J. Clin. Oncol. – 2002. – 20, N 1. – P. 125–133.*
101. *Yamagishi S., Abe R., Inagaki Y. et al. // Am. J. Pathol. – 2004. – 165, N 6. – P. 1865–1874.*
102. *Druesne-Pecollo N., Latino-Martel P., Norat T. et al. // Int. J. Cancer. – 2010. – 127, N 1. – P. 172–184.*

PRINCIPAL AUTHORS OF THE ARTICLES



*Prof. S. Komisarenko
and Prof. H. Yang in Beijing
Genomic Institute (China, 2007)*



Prof. K. P. Zak (Ukraine)



*Prof. S. Komisarenko
and Prof. A. Ciechanover (Israel)
in Palladin Institute of Biochemistry,
Kyiv, 2008*



*Prof. S. Komisarenko
and Prof. M. Sela (Israel)
in New York city, 2001*



*Prof. A. I. Archakov
(Russia)*



Prof. A. I. Tkachuk (Russia)



*Prof. I. Gout
(United Kingdom –
Ukraine)*



*Prof. V. Filonenko
(Ukraine)*



*Prof. O. I. Kiselev
(Russia)*



*Prof. S. Souchelnytskyi
(Sweden – Ukraine)*



*Prof. G. S. Pearson
(United Kingdom)*



*Prof. M. Dando
(United Kingdom)*



*Prof. V. K. Lishko, Dr. T. P. Ugarova, Dr. N. P. Podolnikova,
Dr. I. S. Yermolenko (USA – Ukraine)*



Prof. E. V. Lugovskoy (Ukraine)



Prof. M. V. Skok (Ukraine)



*Dr. L. Borysova and
Prof. T. Burdyga
(United Kingdom – Ukraine)*



*Prof. V. I. Kalchenko and
Prof. S. O. Kosterin (Ukraine)*



*Prof. A. I. Miroshnikov
(Russia)*



*Prof. S. N. Kochetkov
(Russia)*



*Prof. A. M. Egorov
(Russia)*



*Prof. B. B. Dzantiev
(Russia)*



*Prof. E. V. Grishin
(Russia)*



*Prof. D. V. Kolybo
(Ukraine)*



*Prof. G. Kvesitadze
(Georgia)*



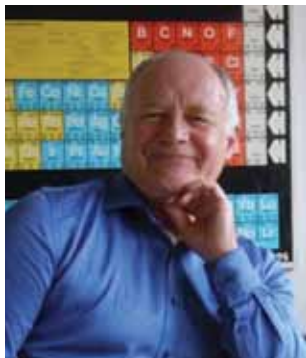
*Prof. V. A. Sidorov
(USA – Ukraine)*



*Prof. V. S. Prassolov
(Russia)*



*Dr. V. A. Halytskiy
(Ukraine)*



*Prof. V. P. Zav'yalov
(Finland – Ukraine)*



*Prof. A. A. Sibirny
(Ukraine)*



Dr. R. Bilyy and Prof. R. Stoika (Ukraine)



*Prof. Christian Birr
(Germany)*



*Prof. T. S. Saatov
(Uzbekistan)*



*Prof. L. B. Drobot
(Ukraine)*



*Dr. A. A. Samoylenko
(Ukraine)*

AUTHORS INDEX

- Abduavaliev A. A.*; Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent
- Andreeva I. P.*; Laboratory of Enzyme Engineering, Chemical Department of Lomonosov Moscow State University; Immunotek of MSU, Moscow, Russia
- Archakov A. I.*; Orekhovich Scientific-Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia
- Bazalii A. V.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Beloglazova I. B.*; Russian Cardiologic Research-Production Complex, RF Ministry of Public Health, Moscow, Russia
- Bilyy R.*; Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv
- Birr Ch., Dr.*; formerly Max-Planck-Institute for Medical Research, Apl. Professor at Heidelberg University, Institute for Organic Chemistry, Heidelberg, Germany
- Borysova L.*; Department of Cellular and Molecular Physiology, Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine
- Burdyga T.*; Department of Cellular and Molecular Physiology, Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom
- Chernobrovkin A. L.*; Orekhovich Scientific-Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia
- Ciechanover A.*; The David and Janet Polak Cancer and Vascular Biology Research Center, The Rappaport Faculty of Medicine and Research Institute, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel
- Dando M.*; Bradford Disarmament Research Centre, Division of Peace Studies School of Social and International Studies, University of Bradford, United Kingdom
- Drobot L. B.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Dzantiev B. B.*; Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Egorov A. M.*; Laboratory of Enzyme Engineering, Chemical Department of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
- Filonenko V.*; Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Gornostaeva A. S.*; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Gout I.*; Department of Structural and Molecular Biology, University College London, United Kingdom; Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

-
- Grigorenko V. G.*; Laboratory of Enzyme Engineering, Chemical Department of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
- Grishin E. V.*; Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Halytskiy V. A.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Kaberniuk A.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Kalchenko V. I.*; Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Kietzmann T.*; Department of Biochemistry and Biocenter Oulu, University of Oulu, Oulu, Finland
- Kiselev O. I.*; Scientific-Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development, St.-Petersbourg, Russia
- Kochetkov S. N.*; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Kolesnikova I. N.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Kolybo D.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Komisarenko S. V.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Kopylov A. T.*; Orekhovich Scientific-Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia
- Korotkevich N.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Korovina A. N.*; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Kosterin S. O.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Kukhanova M. K.*; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Kvesitadze G.*; Georgian National Academy of Sciences
- Labyntsev A.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Lebedev T. D.*; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Lishko V. K.*; The School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ USA
- Lisitsa A. V.*; Orekhovich Scientific-Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia
- Lugovskoy E. V.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Mikhailopulo I. A.*; Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

-
- Minehata M.*; Bradford Disarmament Research Centre Division of Peace Studies School of Social and International Studies University of Bradford, United Kingdom
- Miroshnikov A. I.*; Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Naryzhny S. N.*; Orekhovich Scientific-Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow; Petersburg Nuclear Physics Institute at National Research Centre *Kurchatov Institute*, Russia
- Nemazanyy I.*; Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Novosiolova T.*; Bradford Disarmament Research Centre Division of Peace Studies School of Social and International Studies University of Bradford, United Kingdom
- Oliinyk O.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Orlova N. N.*; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Panasyuk G.*; Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Parfenova E. V.*; Russian Cardiologic Research-Production Complex, RF Ministry of Public Health, Moscow, Russia
- Pearson G. S.*; Visiting Professor of International Security Division of Peace Studies University of Bradford; Bradford, United Kingdom
- Plekhanova O. S.*; Russian Cardiologic Research-Production Complex, RF Ministry of Public Health, Moscow, Russia
- Podolnikova N. P.*; The School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ USA
- Ponomarenko E. A.*; Orekhovich Scientific-Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia
- Prassolov V. S.*; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Romaniuk S.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Rubtsova M. Yu.*; Laboratory of Enzyme Engineering, Chemical Department of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
- Saatov T. S.*; Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent
- Samoylenko A. A.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Sela M.*; Department of Immunology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
- Sibirny A. A.*; Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv; University of Rzeszow, Rzeszow, Poland
- Sidorov V. A.*; Monsanto Co., 700 Chesterfield Parkway W., St. Louis, MO 63017, USA

-
- Skok M. V.*; Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Skorokhod O.*; Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
- Souchelnytskyi S.*; Department of Oncology-Pathology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; AHTeC, Uppsala, Sweden
- Spirin P. V.*; Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Stocking C.*; Heinrich-Pette Institute of Experimental Virology and Immunology, Hamburg, Germany
- Stoika R.*; Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv
- Tkachuk V. A.*; Russian Cardiologic Research-Production Complex, RF Ministry of Public Health, Moscow; Lomonosov Moscow State University, Russia
- Tyurin-Kuzmin P. A.*; Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, Russia
- Ugarova T. P.*; The School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ USA
- Urusov A. E.*; Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Valyakina T. I.*; Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
- Vorotnikov A. V.*; Lomonosov Moscow State University, Faculty of Basic Medicine, Russia
- Yang Huanming*; Beijing Genomic Institute, China
- Yermolenko I. S.*; The School of Life Sciences, Arizona State University, Tempe, AZ USA
- Zak K. P.*; Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv
- Zav'yalov V. P.*; Joint Biotechnology Laboratory, Department of Chemistry, University of Turku, Finland
- Zgoda V. G.*; Orekhovich Scientific-Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia
- Zherdev A. V.*; Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Contents

Leonid KRAVCHUK	5
Boris PATON	10
Serhiy V. Komisarenko. A word from the Editor-in-Chief	13
YANG Huanming «A man of Four» - Mr. Komisarenko in My Eyes	18
ZAK K. P. «From children's slingshot to stem cells» (excerpts from the memoirs of S. Komisarenko)	20
CIECHANOVER Aaron Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and on to human diseases and drug targeting (<i>Nobel lecture</i>)	31
SELA Michael On the notion of synergy of monoclonal antibodies as drugs	61
ARCHAKOV A. I., ZGODA V. G., KOPYLOV A. T., NARYZHNY S. N., CHERNOBROVKIN A. L., PONOMARENKO E. A., LISITSA A. V. Chromosomocentric approach to overcoming difficulties in implementation of international project <i>Human Proteome</i>	64
TKACHUK V. A., PLEKHANOVA O. S., BELOGLAZOVA I. B., PARFENOVA E. V. Role of multidomain structure of urokinase in regulation of growth and remodeling of vessels	83
SKOROKHOD Oleksandr, PANASYUK Ganna, NEMAZANYI Ivan, GOUT Ivan, FILONENKO Valeriy Identification of tudor domain containing 7 protein as a novel partner and a substrate for ribosomal protein S6 kinases – S6K1 and S6K2	128
KISELEV O. I. Immunosuppression under pregnancy and risks under viral infections	140
SOUCHELNYTSKYI Serhiy Individualization of cancer treatment: contribution of OMICs technologies to cancer diagnostic	178
PEARSON Graham S. The vital importance of providing sound scientific advice to policy makers in government	202
NOVOSSIOLOVA Tatyana, MINEHATA Masamichi, DANDO Malcolm The creation of a contagious H5N1 influenza virus: implications for the education of life scientists	219

LISHKO V. K., YERMOLENKO I. S., PODOLNIKOVA N. P., UGAROVA T. P. A novel mechanism controlling the growth of hemostatic thrombi	235
LUGOVSKOY E. V., KOLESNIKOVA I. N., KOMISARENKO S. V. Monoclonal antibodies to study fibrin polymerization and their application for thrombus formation threat diagnostics	253
SKOK M. V. Nicotinic acetylcholine receptors: specific antibodies and functions in humoral immunity	271
BURDYGA T., BORYSOVA L. Seeing is believing! Live confocal imaging of microvascular networks <i>in situ</i> : morphology, Ca ²⁺ signalling and tone	287
KOMISARENKO S. V., KOSTERIN S. O., LUGOVSKOY E. V., KALCHENKO V. I. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes	293
MIKHAILOPULO I. A., MIROSHNIKOV A. I. Some recent findings in the biotechnology of biologically important nucleosides	328
KOROVINA A. N., KUKHANOVA M. K., KOCHETKOV S. N. Search of inhibitors of viral replication herpes: 30 years after acyclovir	354
EGOROV A. M., GRIGORENKO V. G., ANDREEVA I. P., RUBTSOVA M. Yu. Recombinant horseradish peroxidase for analytical applications	369
DZANTIEV B. B., URUSOV A. E., ZHERDEV A. V. Modern techniques of immunochemical analysis: integration of sensitivity and rapidity	382
GRISHIN E. V., VALYAKINA T. I. Generation of monoclonal antibodies against cholera toxin and heat labile enterotoxin of <i>E. coli</i> with the aim of development of the toxins diplex analysis in environmental specimens	400
KOLYBO D., LABYNTSEV A., ROMANIUK S., KABERNIUK A., OLIINYK O., KOROTKEVICH N., KOMISARENKO S. Immunobiology of diphtheria. Recent approaches for the prevention, diagnosis, and treatment of disease	425
KVESITADZE G. Degradation of anthropogenic contaminants by higher plants	459
SIDOROV V. A. Plant tissue culture in biotechnology: recent advances in transformation through somatic embryogenesis	481

LEBEDEV T. D., SPIRIN P. V., ORLOVA N. N., GORNOSTAEVA A. S., STOCKING C., PRASSOLOV V. S. Specific silencing of leukemic oncogenes using RNA-interference approach	506
HALYTSKIY V. A., KOMISARENKO S. V. Non-coding RNAs and epigenome: <i>de novo</i> DNA methylation, allelic exclusion and X-inactivation	517
ZAV'YALOV V. P. Polyadhesins: an armory of gram-negative pathogens for penetration through the immune shield	539
SIBIRNY A. A. Sensing and signaling for peroxisome autophagic degradation (pexophagy) in yeasts	586
BILYY R., STOIKA R. Sweet taste of cell death: role of carbohydrate recognition systems	615
BIRR Christian The GMP-based drug substance SCTL development aiming at prevention of opportunistic infections after X-Ray- and chemotherapy of cancer. A synthetic combinatorial tetrapeptide library substitution for calf Thymus Extract	637
SAATOV T. S., ABDUAVALIEV A. A. Biological effects of thyroid hormones	653
DROBOT L. B., SAMOYLENKO A. A., VOROTNIKOV A. V., TYURIN-KUZMIN P. A., BAZALII A. V., KIETZMANN T., TKACHUK V. A., KOMISARENKO S. V. Reactive oxygen species in signal transduction	672
Principal authors of the articles	687
Authors index	693

Зміст

КРАВЧУК Л. М.....	5
ПАТОН Б. Є.	10
КОМИСАРЕНКО С. В. Слово головного редактора	13
YANG Huanming «A man of Four» - Mr. Komisarenko in My Eyes	18
ЗАК К. П. «От детской рогатки до стволовой клетки» (отрывки из воспоминаний о С. В. Комисаренко)	20
СІЕCHANOVER Aaron Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and on to human diseases and drug targeting (<i>Nobel lecture</i>)	31
SELA Michael On the notion of synergy of monoclonal antibodies as drugs	61
АРЧАКОВ А. И., ЗГОДА В. Г., КОПЫЛОВ А. Т., НАРЫЖНЫЙ С. Н., ЧЕРНОБРОВКИН А. Л., ПОНОМАРЕНКО Е. А., ЛИСИЦА А. В. Хромосомотцентричный подход к преодолению трудностей в реализации международного проекта «Протеом человека»	64
ТКАЧУК В. А., ПЛЕХАНОВА О. С., БЕЛОГЛАЗОВА И. Б., ПАРФЕНОВА Е. В. Роль мультидоменной структуры урокиназы в регуляции роста и ремоделирования сосудов	83
SKOROKHOD Oleksandr, PANASYUK Ganna, NEMAZANYI Ivan, GOUT Ivan, FILONENKO Valeriy Identification of tudor domain containing 7 protein as a novel partner and a substrate for ribosomal protein S6 kinases – S6K1 and S6K2	128
КИСЕЛЕВ О. И. Иммуносупрессия при беременности и риски при вирусных инфекциях	140
SOUCHELNYTSKYI Serhiy Individualization of cancer treatment: contribution of OMICs technologies to cancer diagnostic	178
PEARSON Graham S. The vital importance of providing sound scientific advice to policy makers in government	202
NOVOSSIOLOVA Tatyana, MINEHATA Masamichi, DANDO Malcolm The creation of a contagious H5N1 influenza virus: implications for the education of life scientists	219

LISHKO V. K., YERMOLENKO I. S., PODOLNIKOVA N. P., UGAROVA T. P. A novel mechanism controlling the growth of hemostatic thrombi	235
LUGOVSKOY E. V., KOLESNIKOVA I. N., KOMISARENKO S. V. Monoclonal antibodies to study fibrin polymerization and their application for thrombus formation threat diagnostics	253
SKOK M. V. Nicotinic acetylcholine receptors: specific antibodies and functions in humoral immunity	271
BURDYGA T., BORYSOVA L. Seeing is believing! Live confocal imaging of microvascular networks <i>in situ</i> : morphology, Ca ²⁺ signalling and tone	287
KOMISARENKO S. V., KOSTERIN S. O., LUGOVSKOY E. V., KALCHENKO V. I. Calixarene methylene bisphosphonic acids as promising effectors of biochemical processes	293
МИХАЙЛОПУЛО I. A., МИРОШНИКОВ A. I. Some recent findings in the biotechnology of biologically important nucleosides	328
КОРОВИНА А. Н., КУХАНОВА М. К., КОЧЕТКОВ С. Н. Поиск ингибиторов репликации вируса герпеса: 30 лет после ацикловира	354
EGOROV A. M., GRIGORENKO V. G., ANDREEVA I. P., RUBTSOVA M. Yu. Recombinant horseradish peroxidase for analytical applications	369
DZANTIEV B. B., URUSOV A. E., ZHERDEV A. V. Modern techniques of immunochemical analysis: integration of sensitivity and rapidity	382
ГРИШИН Е. В., ВАЛЯКИНА Т. И. Получение моноклональных антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину <i>E. coli</i> для разработки биплексного анализа токсинов в объектах окружающей среды	400
KOLYBO D., LABYNTSEV A., ROMANIUK S., KABERNIUK A., OLIINYK O., KOROTKEVICH N., KOMISARENKO S. Immunobiology of diphtheria. Recent approaches for the prevention, diagnosis, and treatment of disease	425
KVESITADZE G. Degradation of anthropogenic contaminants by higher plants	459
SIDOROV V. A. Plant tissue culture in biotechnology: recent advances in transformation through somatic embryogenesis	481

LEBEDEV T. D., SPIRIN P. V., ORLOVA N. N., GORNOSTAEVA A. S., STOCKING C., PRASSOLOV V. S. Specific silencing of leukemic oncogenes using RNA-interference approach	506
HALYTSKIY V. A., KOMISARENKO S. V. Non-coding RNAs and epigenome: <i>de novo</i> DNA methylation, allelic exclusion and X-inactivation	517
ZAV'YALOV V. P. Polyadhesins: an armory of gram-negative pathogens for penetration through the immune shield	539
SIBIRNY A. A. Sensing and signaling for peroxisome autophagic degradation (pexophagy) in yeasts	586
BILYY R., STOIKA R. Sweet taste of cell death: role of carbohydrate recognition systems	615
BIRR Christian The GMP-based drug substance SCTL development aiming at prevention of opportunistic infections after X-Ray- and chemotherapy of cancer. A synthetic combinatorial tetrapeptide library substitution for calf Thymus Extract	637
СААТОВ Т. С., АБДУВАЛИЕВ А. А. Биологические эффекты гормонов щитовидной железы	653
DROBOT L. B., SAMOYLENKO A. A., VOROTNIKOV A. V., TYURIN-KUZMIN P. A., BAZALII A. V., KIETZMANN T., ТКАЧУК В. А., КОМИСАРЕНКО С. В. Reactive oxygen species in signal transduction	672
Головні автори статей	687
Авторський покажчик	693

НАШІ ПАРТНЕРИ І СПОНСОРИ:

- Національна академія наук України
- ООО НПК «Екофарм»
- Фармацевтична фірма «Дарниця»
- ВАТ «Фармак»
- «Макрохім (АЛТ Україна)»
- Український науково-технологічний центр (УНТЦ)
- «АЛСІ» ЛТД
- «ДОНАУ ЛАБ»
- ООО «МАНКОР»
- ООО «ОПТЕК»

SUPPORT OF THE CONFERENCE BY THE FOLLOWING SPONSORS IS GRATEFULLY ACKNOWLEDGED:

- National Academy of Sciences of Ukraine
- “EKOFORM”
- Pharmaceutical Company “DARNITSA”
- FARMAC Joint-Stock Company
- MACROCHEM (ALT Ukraine)
- Science & Technology Center in Ukraine (STCU)
- “ALSI” Ltd
- “DONAU LAB”
- “MANKOR”
- “OPTEC”



Наукове видання

**BIOCHEMISTRY and BIOTECHNOLOGY
for MODERN MEDICINE**

Edited by Prof. Serhiy KOMISARENKO

Редагування і коректура

В. М. Данилова, А. П. Дем'яненко, М. В. Григор'єва, О. М. Кінер

Оригінал-макет підготовлено

в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України

Комп'ютерна верстка *Т. М. Петренко*

Підписано до друку 21.06.2013. Формат 70 x 100 1/16.

Папір офсетний 80 г/м². Гарн. Тип Newton. Друк офсетний.

Облік.-видав. арк. 51,6. Наклад 500 прим. Замовлення 917/09.

Надруковано у друкарні ФОП Москаленко О. М.,

Київ, вул. Серафимовича, 3/1, оф. 144,

тел.: (050) 380-29-16; (097) 390-50-18.

Свід. ДК 3304 від 28.10.2008

Біохімія і біотехнологія – сучасній медицині / Голов. ред. С. В. Комісаренко. – К.:
ФОП Москаленко О. М., 2013, 704 с.

ISBN 978-966-2214-30-7

Монографія певною мірою є унікальною. Це – зібрання статей, присвячених найактуальнішим проблемам сучасних медико-біологічних наук, як фундаментальних, так і таких, що безпосередньо стосуються медичних наук, зокрема онкології, ендокринології, діагностики та лікування інфекційних захворювань. Автори статей – переважно світові лідери з певних напрямів біології – біохімії, молекулярної та клітинної біології, біотехнології, а також суміжних наук. Серед авторів є і найвідоміші вчені світу, і молоді талановиті науковці, але всіх головних авторів статей об'єднує те, що вони є колегами, друзями або співробітниками академіка НАН України С. В. Комісаренка, 70-річному ювілею якого вони присвятили свої статті.

Книгу орієнтовано на широке коло читачів – фахівців, які працюють в експериментальних і прикладних напрямках медико-біологічних наук.