

УДК 579.255:[591.145:616.931]

Перспективы применения рекомбинантных производных дифтерийного токсина

© 2012 г. С. И. Романюк #, Д. В. Колибо, С. В. Комисаренко

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев

Поступила в редакцию 12.10.2011г. Принята к печати 25.11.2011г.

Дифтерийный токсин (ДТ) является уникальным бактериальным протеином, состоящим из трех доменов, которые обладают различными биологическими функциями. Создавая с помощью генной инженерии разные рекомбинантные конструкции ДТ с заданными свойствами, можно получать уникальные инструменты для клеточной биологии, а также токсины, эффективно и избирательно воздействующие на определенные популяции клеток. В обзоре освещены структурно-функциональные особенности молекулы ДТ, его фрагментов и доменов, а также основные области использования его рекомбинантных производных. В частности, обсуждаются перспективы практического применения рекомбинантных производных ДТ при создании иммунобиологических препаратов, цитотоксинов, блокаторов гепаринсвязывающего фактора роста, подобного эпидермальному фактору роста (НВ-EGF), белковых конструкций для направленного транспорта веществ в клетку, а также возможности использования рекомбинантных производных ДТ для лечения и профилактики ряда заболеваний.

Ключевые слова: дифтерийный токсин, фрагменты и домены дифтерийного токсина, рекомбинантные белки, гепаринсвязывающий фактор роста, подобный эпидермальному фактору роста (НВ-EGF), вакцины, цитотоксины.

Сокращения: ДТ – дифтерийный токсин, CRM (от англ. “cross-reacting material”) – перекрестно-реагирующий материал (мутантный дифтерийный токсин, близкий по антигенным свойствам к дифтерийному токсину), НВ-EGF (от англ. “heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor”) – гепаринсвязывающий фактор роста, подобный эпидермальному фактору роста, IL (от англ. “interleukin”) – интерлейкин, scFv (от англ. “single-chain fragment variable”) – одноцепочечные переменные фрагменты антител.

Автор для связи: sirparnas@gmail.com; тел.: +38(044)234-33-54; ф.: +38(044)279-63-65

Дифтерийный токсин (ДТ) представляет собой глобулярный белок, принадлежащий к семейству бактериальных экзотоксинов АВ-типа [1]. Он является главным фактором патогенности возбудителя дифтерии *Corynebacterium diphtheriae* [2], однако кодируется геном коринефага, инфицирующего эту бактерию [3]. ДТ является наиболее токсичным среди белковых токсинов по отношению к чувствительным клеткам *in vitro* (для гибели клетки достаточно одной молекулы токсина [4]), хотя по влиянию на организм ДТ уступает ботулиническому и столбнячному нейротоксинам [5]. Высокая токсичность ДТ открыла перспективы применения его производных в медицинской практике и привлекла внимание исследователей к изучению структуры и механизма действия этого токсина.

При изучении антигенных свойств ДТ были выделены не обладающие цитотоксичностью мутантные формы токсина, названные CRM (от англ. – cross-reacting material) из-за их способности перекрестно реагировать в реакции преципитации с иммунными сыворотками против ДТ [6]. Однако химически конъюгированные химерные белки на основе CRM не нашли широкого применения в медицине, поскольку они не отвечали требованиям стабильности и процесс их получения не мог быть полностью стандартизирован.

Развитие методов генной инженерии сделало возможным получение рекомбинантных дифтерийных токсидов с мутациями в разных фрагментах, которые в настоящее время все чаще используются как в фундаментальных научных исследованиях, так и в медицинской практике (рис. 1). Быстрые темпы развития этого направления и прогресс в области методов молекулярной биологии делают актуальной задачу оценки перспектив использования рекомбинантных производных ДТ в различных областях деятельности человека.

1. Структура молекулы ДТ. Применение рекомбинантных производных токсина для изучения механизма его действия.

ДТ кодируется нуклеотидной последовательностью гена *tox* (1683 п.о.), которая абсолютно идентична у коринефагов β [7], γ [8] и ω [9], что свидетельствует о высокой консервативности этого гена и важности всех элементов молекулы токсина для реализации цитотоксической функции.

ДТ имеет молекулярную массу 58 358 Да и представляет собой полипептид, состоящий из 560 а.о., 25 из которых входят в состав лидерного пептида [10]. Между цистеинами в положениях 186-201 и 461-471 образованы две дисульфидные связи [11]. На рис. 2 представлена схема структуры молекулы ДТ, состоящей из двух фрагментов: фрагмента А

(от англ. *Active*) (21 164 Да), представляющего собой каталитический С-домен, и фрагмента В (от англ. *Binding*) (37 194 Да), состоящего из транспортного Т-домена и рецепторсвязывающего R-домена [11]. Каждый из трех доменов ДТ выполняет определенную биологическую функцию при реализации цитотоксического действия. С-Концевой R-домен (386-535) связывается с рецептором на поверхности клетки [12], Т-домен (205-378) обеспечивает транслокацию С-домена в цитозоль [13], а N-концевой С-домен (1-193) катализирует реакцию NAD^+ -зависимого ADP-рибозилирования фактора элонгации трансляции эукариот eEF2, что приводит к остановке синтеза белка в клетке [14] и ее гибели путем апоптоза [15].

С помощью мутантных дифтерийных токсидов было установлено, что за взаимодействие с рецептором клетки-мишени отвечает гидрофобный С-концевой участок (482-535) R-домена ДТ [12] (рис. 3). Пространственная структура R-домена представлена двумя слоями, прилегающими друг к другу: четырехскладчатый слой образован складками RB2, RB3, RB5 и RB8, а пятискладчатый – складками RB4, RB6, RB7, RB9 и RB10 [11]. Установление водородных связей между складкой RB6 и обоими слоями приводит к образованию β -цилиндрической структуры “рулета с джемом”, которая встречается у многих белков, взаимодействующих с углеводными остатками. Дисульфидная связь 461-471 удерживает петлю из 9 а.о., возле которой расположен фосфатсвязывающий "Р-сайт" (456-458-460-472-474) с неизвестной функцией [11]. Важную роль в распознавании рецептора играют остатки Lys516 и Phe530, а также, возможно, Tyr514, Val523, Asn524 и Lys526, которые находятся в пределах экспонируемого участка R-домена [16].

Активация ДТ происходит при расщеплении пептидной связи между фрагментами А и В на участке 186-201 под действием протеиназ (например, фурина [17]) в присутствии восстановителей дисульфидных связей. Проникновение комплекса активированного токсина с клеточным рецептором в эндосому, для которой характерны более низкие значения рН (4.5-5.5), обеспечивает конформационные перестройки в Т-домене [18], который является специализированным рН-зависимым шапероном, обеспечивающим транслокацию С-домена через мембрану эндосомы в цитозоль [19].

Т-домен состоит из девяти спиралей, собранных в 3 слоя. Первый слой образуют 2 длинные гидрофобные С-концевые спирали ТН8 и ТН9, второй слой – 3 гидрофобные спирали ТН5-ТН7, третий – 4 спирали ТН1-ТН4, имеющие гидрофильные свойства [11]. Получение дифтерийных токсидов, способных связываться с рецептором и проявлять каталитическую активность, но неспособных к транслокации, например CRM503 [20],

позволило выявить важные для транслокации участки молекулы токсина. Протонирование при низких рН остатков Glu349 и Asp352 (рис. 3) приводит к погружению “шпильки” ТН8/9 в мембрану [21]. При глубоком погружении спирали ТН5-ТН7 также входят в мембрану, причем спираль ТН5 наряду со спиралями ТН8 и ТН9 принимает участие в образовании поры. Спирали ТН6 и ТН7 могут формировать “пробку”, частично блокирующую трансмембранную пору [22]. Вероятно, важную роль в процессе транслокации играет также протонирование остатка His257, поскольку замена His257Arg приводит к нарушению упорядоченной структуры Т-домена и его погружению в мембрану даже при нейтральных рН [23]. Свойство Т-домена погружаться в мембрану напрямую связано с его способностью стимулировать слияние ранних эндосом [24] и, возможно, вызывать задержку их созревания, что может быть важно для прохождения процесса транслокации.

В последние годы получены данные об участии в транслокации С-домена некоторых цитозольных белков, например, белков везикулярного транспорта СОР1, взаимодействующих с остатками Lys спирали ТН1 [25], актина [26], шаперона Hsp 90 и тиоредоксинредуктазы [27]. Однако однозначная концепция механизма транслокации пока не сформулирована, что обуславливает необходимость и перспективность дальнейшего изучения этого процесса, в том числе и с применением рекомбинантных производных ДТ.

С-домен, осуществляющий NAD^+ -зависимое ADP-рибозилирование фактора элонгации eEF2, состоит из двух β -складчатых субдоменов, складки которых ориентированы почти перпендикулярно и образуют ядро домена. Первый субдомен состоит из складок СВ2, СВ4, СВ8, которые окружены спиралями СН2, СН3, СН6 и СН7. Второй субдомен состоит из складок СВ1, СВ3, СВ5, СВ6 и СВ7, которые окружены спиралями СН1, СН4, СН5. Четыре петли CL1-CL4 соединяют два субдомена, обеспечивая гибкость С-домена, что важно для трансмембранного переноса. Активный центр С-домена представляет собой щель, образованную складками СВ2, СВ3, СВ7 и спиралью СН3, вход в которую экранирован петлей CL2 и складкой RB6 R-домена [11], что объясняет необходимость отщепления фрагмента В для активации токсина (рис. 3). Аминокислотные остатки, входящие в состав активного центра, были выявлены с помощью токсидов с мутациями в С-домене, например, CRM228 [28] и CRM197 [29].

За счет взаимодействия с аминокислотными остатками His21, Thr23, Tyr54, Tyr65 и Glu148 [30] (рис. 3) активный центр С-домена связывает NAD^+ в уникальной конформации, при которой карбоксиамидная группа NAD^+ находится в *транс*-положении, хотя более стабильным для нее является *цис*-положение [31]. Важными для связывания NAD^+ являются

также аминокислотные остатки Tyr27 и Trp50 [32]. При взаимодействии NAD^+ с Pro38, а также, возможно, с Tyr54 и Trp153 нарушаются водородные связи, которые стабилизируют петлю 39-47 в активном центре ДТ. Нарушение упорядоченности этой петли и взаимодействие с 2'-гидроксильными группами рибозы и отрицательно заряженными фосфатными группами NAD^+ является важным условием для распознавания eEF2 [30].

ADP-рибозильный остаток присоединяется к молекуле eEF2 через α -гликозидную связь с первым атомом азота имидазольного кольца уникального аминокислотного остатка – дифтамида (2-[3-карбоксамидо-3-(триметиламмоний)-пропил]гистидина) [33], который образуется в результате многоступенчатой сайт-специфичной посттрансляционной модификации His715 [34]. Реакция ADP-рибозилирования протекает по механизму мономолекулярного нуклеофильного замещения $S_{\text{N}}1$: отщепление никотинамидной группы приводит к формированию интермедиата – карбокатиона, который в дальнейшем подвергается атаке со стороны нуклеофильного дифтамида [35]. Полагают, что ДТ во время реакции копирует естественную конформацию 80S рибосомы эукариот для взаимодействия с eEF2 [36]. Присоединение ADP-рибозила к дифтамиду eEF-2 приводит к остановке синтеза белка за счет нарушения транслокации пептидил-тРНК из А-сайта в Р-сайт [37], а также ослабляет взаимодействие eEF-2 с сарцин/рициновым доменом 28S РНК рибосомы [38].

Таким образом, в молекуле ДТ прослеживаются четкие взаимосвязи между отдельными структурными элементами и выполнением ими определенных функций, необходимых для реализации механизма действия токсина. Развитие методов молекулярной и клеточной биологии дает практически неограниченные возможности для использования структурных компонентов молекулы ДТ с целью конструирования его производных с заданными свойствами.

2. Использование рекомбинантных производных ДТ при создании систем направленного транспорта белков и пептидов в клетку.

Несмотря на недостаточно ясное представление о механизме транслокации ДТ, его Т-домен все больше привлекает внимание исследователей как перспективный транспортер терапевтических препаратов и вакцин в клетки. Для направленного транспорта могут использоваться дифтерийные токсиды, лишенные каталитической активности, в которых R-домен заменен на лиганд, обеспечивающий связывание с рецепторами определенного типа клеток. Белки-“пассажиры”, как правило, присоединяются к N-концу фрагмента А токсоида и при переносе следуют за фрагментом А [39]. Показано, что с помощью таких конструкций через цитоплазматическую мембрану могут переноситься полипептиды с молекулярной

массой до 20 кДа; более того, двойной фрагмент А с молекулярной массой 42 кДа также может переноситься через мембрану [40].

Посредством транспортных конструкций на основе ДТ можно доставлять в цитоплазму клеток белки, влияющие на внутриклеточные процессы. Например, с помощью рекомбинантного белка, полученного присоединением ингибитора апоптоза Bcl-xL к N-концу R-домена ДТ, можно ингибировать апоптоз клеток [41]. Подобные слитые белки могут найти применение при лечении заболеваний, связанных с нарушениями экспрессии ингибиторов и активаторов апоптоза. Теоретически возможно, что такой подход удастся использовать для изучения действия других внутриклеточных белков-регуляторов, в том числе и транскрипционных факторов.

Интересным направлением использования рекомбинантных транспортных конструкций на основе дифтерийных токсидов является введение пептидов в цитозоль клеток с целью индукции иммунного ответа, рестриктированного по антигенам МНС I класса, и активации цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, способных распознавать эти пептиды [39]. Так, в экспериментах на трансгенных мышах CD11c-DTR, дендритные клетки которых имели рецепторы HB-EGF человеческого типа, после введения дифтерийного токсоида, слитого с овальбумином, наблюдалась значительная стимуляция пролиферации CD8⁺ Т-клеток, специфичных к овальбумину [42].

Подобные рекомбинантные транспортеры могут быть созданы не только на основе дифтерийных токсидов, но и на основе некоторых других бактериальных токсинов, например, токсина возбудителя сибирской язвы [43].

3. Использование рекомбинантных производных ДТ для изучения экспрессии клеточных рецепторов.

Для изучения экспрессии клеточных рецепторов можно использовать слитые белки, состоящие из фрагмента А ДТ и специфического лиганда. Клетки, несущие рецепторы к данному лиганду, оказываются чувствительными к токсическому воздействию такого слитого белка. Это дает возможность использовать подобные рекомбинантные конструкции, например, для подтверждения успешной экспрессии рецепторов трансгенными клетками [44].

R-домен ДТ сам по себе является селективным лигандом для трансмембранной формы HB-EGF (гепаринсвязывающего фактора роста, подобного эпидермальному фактору роста) [45]. Мы предложили использовать рекомбинантный слитый белок, состоящий из зеленого флуоресцентного белка (EGFP) и фрагмента В ДТ, как флуоресцентный зонд для изучения

экспрессии HB-EGF на клетках [46]. Такие зонды могут найти применение в медицинской практике, поскольку изменение уровня экспрессии рецептора HB-EGF на клетках является важным диагностическим признаком развития некоторых патологических процессов, в частности, опухолевой трансформации клеток.

4. Рекомбинантные производные ДТ как блокаторы HB-EGF и антитоды.

HB-EGF, трансмембранная форма которого является рецептором для ДТ, выполняет ряд важных функций в организме: стимулирует пролиферацию и миграцию клеток, принимает участие во многих нормальных физиологических процессах, таких как имплантация бластоцисты во время беременности [47], заживление ран [48], восстановление нейронов после гипоксии и ишемии [49]. Кроме того, HB-EGF, вероятно, участвует в таких патологических процессах, как рост опухолей [50], гиперплазия клеток гладких мышц и атеросклероз [51]. Поэтому существует вероятность, что антагонисты HB-EGF, в том числе и мутантные формы ДТ, могут применяться в терапевтических целях.

Известно, что нетоксичный аналог ДТ с точечной мутацией Gly52Glu в каталитическом домене – CRM197 ингибирует митогенную активность зрелого и трансмембранного HB-EGF [52], вероятно, блокируя его взаимодействие с рецепторами HER2 и HER4. Недавно было показано, что CRM197 либо малые интерферирующие РНК к гену HB-EGF могут блокировать на разных этапах перитонеальную диссеминацию некоторых типов опухолей, что открывает перспективы создания нового класса лекарственных средств для борьбы с HB-EGF-зависимыми опухолями [53]. Цитотоксическими свойствами по отношению к опухолевым клеткам обладает также фрагмент В ДТ [54] и, вероятно, подобные свойства могут быть выявлены у его R-домена. Кроме того, существует потенциальная возможность использования рекомбинантных блокаторов HB-EGF на основе ДТ в качестве антитодов при лечении дифтерии. Например, рекомбинантный R-домен токсина (378-535) может использоваться для блокирования связывания ДТ с рецептором HB-EGF на клетках-мишенях [55]. Также были предприняты попытки использования в качестве антитода против дифтерии EGF-подобного (106-149)-домена HB-EGF, который по сравнению с полноразмерным рецептором характеризуется большим сродством к ДТ и не способен к неспецифическому связыванию с гепарансульфатными протеогликанами, представленными в большом количестве на поверхности клеток. Для исключения собственной биологической активности рекомбинантного продукта использовали EGF-подобный домен мутантного HB-EGF, утратившего митогенную активность благодаря аминокислотным заменам Ile117Ala и Leu148Ala [56].

Недостатком вышеупомянутых рекомбинантных белков, препятствующим их широкому практическому применению, является возможность появления побочных эффектов, вызванных непредвиденным взаимодействием данных конструкций с другими белками на поверхности и внутри клеток.

5. Использование рекомбинантных производных ДТ для изучения роли различных популяций клеток в биологических процессах.

С развитием методов генной инженерии появилась возможность создания рекомбинантных производных ДТ для избирательного уничтожения в организме клеток определенного типа с целью изучения их функций и роли в тех или иных биологических процессах. Чаще всего с такой целью рекомбинантные производные ДТ используются в двух рассмотренных ниже экспериментальных моделях.

Первая экспериментальная модель основывалась на использовании трансгенных мышей, имевших на клетках определенного типа трансмембранную форму НВ-EGF человека, которая является рецептором к ДТ, что позволяло избирательно уничтожать эти клетки введением природного ДТ или дифтерийных токсидов с ослабленными токсическими свойствами. Применение трансгенных мышей с рецептором для ДТ под промотором гена CD11b позволило избирательно уничтожить клетки моноцитарно-макрофагального ряда и изучить их роль в патогенезе атеросклероза и в формировании атеросклеротических бляшек [57].

Вторая экспериментальная модель основывалась на использовании трансгенных мышей, у которых под специфический промотор уникального гена, экспрессирующегося в этих клетках, встроен непосредственно ген, кодирующий А-фрагмент ДТ. Например, встраивание этого гена под промотор гена гранзима А, позволяет уничтожать цитотоксические Т-клетки [58]. Такой подход был применен для изучения роли клеток Лангерганса в развитии контактной гиперчувствительности [59]. Следует, однако, отметить, что создание трансгенных мышей является довольно трудоемким процессом, а ген фрагмента А токсина из-за случайной интеграции может неспецифично экспрессироваться в клетках и других типов, что приводит к их непредвиденному уничтожению. Поэтому в настоящее время ведутся исследования, направленные на совершенствование данного подхода [60].

6. Цитотоксины на основе ДТ для лечения онкологических, аутоиммунных, вирусных и других заболеваний.

Важной областью применения фрагментов и рекомбинантных производных ДТ является создание цитотоксинов, которые состоят из двух компонентов: мутантного дифтерийного токсоида, обладающего токсичностью, но не способного взаимодействовать с рецептором нативного ДТ, и компонента, обеспечивающего специфическое связывание с определенным типом клеток. В качестве такого компонента могут выступать антитела к поверхностным антигенам клеток или лиганды, которые специфично связываются с клеточными рецепторами. Для создания цитотоксинов используют различные дифтерийные токсиды, чаще всего – DAB388, DAB389 (DAB – от англ. “Diphtheria toxin A and B fragments”) и CRM107. Все эти токсиды лишены способности взаимодействовать с рецептором ДТ: DAB388 не имеет R-домена [61], DAB389 имеет только 50 C-концевых аминокислотных остатков этого домена и характеризуется повышенной стойкостью к протеиназам [62], а CRM107 имеет 2 точечные мутации R-домена - Leu390Phe и Ser525Phe [63]. Иногда применение природного ДТ, который обладает высокой токсичностью, не позволяет добиться достаточной избирательности при уничтожении некоторых, особенно небольших, популяций клеток. В таких случаях могут применяться ослабленные (в 15-30 раз менее токсичные) токсиды, например CRM176, который менее токсичен благодаря аминокислотной замене Gly128Asp вблизи активного центра C-домена [64].

На сегодняшний день все шире применяются цитотоксины, полученные заменой R-домена ДТ на последовательность определенного интерлейкина (IL). Наиболее эффективным является цитотоксин, содержащий последовательность IL-2 (DAB389IL-2, Denileukin Diftitox, ONTAK), способный уничтожать активированные T-лимфоциты и моноциты, экспрессирующие рецепторы к IL-2 [65], и дающий позитивные результаты в приживлении трансплантатов, а также при лечении T-лимфом [66], атеросклероза [67], шистозоматоза [68], синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) и некоторых аутоиммунных заболеваний [69]. Интересно, что применение DAB389IL-2 может усиливать эффект противоопухолевых вакцин на основе дендритных клеток, трансфицированных РНК опухолевых клеток [70]. Цитотоксины с последовательностями IL-3 и IL-7 эффективны при лечении лейкемий [71, 72]. Цитотоксины с последовательностью IL-4 используют для уничтожения В-клеток, продуцирующих иммуноглобулины класса Е, играющие ключевую роль в развитии аллергических реакций [73], а также при лечении саркомы Капоши, часто возникающей у больных СПИД [74]. Цитотоксины с последовательностью IL-13 используют при лечении опухолей мозга [75].

Зачастую для создания цитотоксинов подбирают мутантные варианты интерлейкинов с повышенной аффинностью к рецептору, например DT388IL-3[Lys116Trp] [61]. Помимо интерлейкинов, перспективными компонентами противоопухолевых цитотоксинов считаются колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов GM-CSF [76], фактор роста эндотелия сосудов [77], трансферин [78] и α -меланоцитстимулирующий гормон [79]. Цитотоксины, полученные путем замены R-домена дифтерийного токсоида на эпидермальный фактор роста (EGF), могут применяться для предотвращения чрезмерного роста клеток гладких мышц и образования атеросклеротических бляшек [80], а также для избирательного поражения опухолей, экспрессирующих повышенное количество рецепторов к этому фактору роста.

Выделяют отдельный класс цитотоксинов – *иммуоцитотоксины*, в состав которых входят иммунные компоненты – антитела или их рекомбинантные аналоги, способные к высокоспецифичному связыванию с антигеном на поверхности определенного типа клеток и к доставке токсоида в клетку путем рецепторзависимого эндоцитоза. Среди антител эффективными компонентами иммуоцитотоксинов оказались, например, моноклональные антитела к антигену Т-лимфоцитов – комплексу CD3 [81] и к цепям Т-клеточного рецептора [82]. Такие цитотоксины применяют для уничтожения Т-клеток при пересадках органов в сочетании с введением донорского костного мозга. Кроме того, перспективными компонентами иммуоцитотоксинов являются антитела к маркеру В-клеток – CD20 [83] и к специфическим опухолевым антигенам [84], антитела против α -цепи рецептора IL-2 (CD25), который экспрессируется на пролиферирующих Т-лимфоцитах человека [85], а также антитела против гликопротеинов gp120 и gp41 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и против поверхностных антигенов инфицированных ВИЧ-клеток [86]. Для борьбы с ВИЧ созданы также цитотоксины, состоящие из дифтерийного токсоида и двух доменов рецептора CD4 человека, которые взаимодействуют с вирусным антигеном gp120, экспрессированным на поверхности инфицированных клеток [87].

Одним из способов защиты цитотоксинов от антител, которые синтезируются в организме в ответ на их введение, является включение цитотоксинов в состав фузогенных липосом [88]. Однако такие липосомы способны сливаться с любыми клетками и могут использоваться только локально, например, для лечения солидных опухолей. Другим способом решения данной проблемы является максимальное снижение иммуногенности цитотоксинов. С этой целью вместо целых молекул антител часто используют рекомбинантные scFv-антитела (от англ. “single chain fragment variable”) – одноцепочечные

вариабельные фрагменты антител, способные связываться с поверхностными антигенами клетки [85]. Кроме того, одним из перспективных способов уменьшения иммуногенности цитотоксинов на основе ДТ является создание мутантных токсидов, у которых отсутствуют наиболее иммуногенные эпитопы.

Для уничтожения определенных типов клеток применяют не только белковые конструкции, но и ДНК-последовательности, кодирующие токсичные фрагменты ДТ, (ДНК-цитотоксины), которые транспортируются в клетки в составе липосом, наночастиц, капсидов различных вирусов или с помощью специальных полимеров [89]. Наиболее простым вариантом ДНК-цитотоксина является ДНК-последовательность А-фрагмента ДТ, которая встраивается под промотор гена, уникального для данного типа клеток, либо под промотор гена протеина теплового шока, что позволяет регулировать экспрессию цитотоксина с помощью температуры [90]. Такие ДНК-цитотоксины разрабатываются для уничтожения определенных популяций клеток (например, зрелых CD8⁺ Т-клеток [58] или В-клеток [91]) перед трансплантацией органов и тканей, а также при лечении онкологических заболеваний.

Другой разновидностью ДНК-цитотоксинов являются ДНК-конструкции, которые после трансформации вызывают не гибель клеток, а стабильную экспрессию в них цитотоксина, специфично уничтожающего клетки другого типа. Например, для лечения острой миелоидной лейкемии создан ДНК-цитотоксин, вызывающий в Т-лимфоцитах синтез цитотоксина DAB389-IL4, токсичного по отношению к трансформированным В-клеткам [92].

Третьей разновидностью ДНК-цитотоксинов являются ДНК-протекторы – плазмиды, содержащие нуклеотидную последовательность А-фрагмента ДТ под промотором гена определенного вируса, например ВИЧ [93]. Трансформированная такой плазмидой клетка быстро гибнет в случае проникновения в неё вируса. Поскольку ДТ токсичен не только для клеток человека и животных, но и для клеток растений, получены ДНК-протекторы против вирусов растений. Например, ген А-фрагмента ДТ был встроен с помощью агробактерий в клетки табака [94].

Следует отметить, что ДНК-конструкции, которые создаются для генной терапии, должны с высокой эффективностью проникать в клетки, обладать минимальной неспецифической токсичностью и не экспрессироваться в здоровых клетках.

7. Использование рекомбинантных производных ДТ при создании диагностических тест-систем и противодифтерийных иммунотерапевтических препаратов.

Обычно в иммунодиагностикумах (как и в противодифтерийных вакцинах) в качестве антигена используется нетоксичный дифтерийный анатоксин, полученный путем обработки токсина формальдегидом [95]. Дифтерийный анатоксин по своей антигенной структуре подобен ДТ. Однако из-за частичной модификации его поверхностных групп формальдегидом анатоксин утрачивает некоторые эпитопы нативного ДТ [96].

Рекомбинантные аналоги ДТ хотя и несколько отличаются от нативного ДТ в антигенном отношении, но весьма незначительно по сравнению с дифтерийным анатоксином. Кроме того, методами генной инженерии легко могут быть получены любые диагностически важные рекомбинантные фрагменты ДТ и генетически слитые белки на их основе. Так, нами были получены рекомбинантные А- и В-фрагменты ДТ [97], а также слитый белок, состоящий из В-фрагмента ДТ и зеленого флуоресцентного белка EGFP [46]. Проведенные нами исследования показали, что у больных дифтерией, в отличие от носителей инфекции и здоровых вакцинированных людей, антитела против фрагмента А часто преобладают над антителами против фрагмента В [98], и рекомбинантные А- и В-фрагменты ДТ могут быть использованы в дифференциальной диагностике дифтерии [99].

Другой областью применения рекомбинантных фрагментов ДТ является получение антител, специфичных к определенным участкам молекулы ДТ, которые могут использоваться в тест-системах для выявления ДТ на основе “сэндвич”-ИФА (иммуоферментного анализа), а также входить в состав иммунотерапевтических препаратов для лечения больных дифтерией. Известно, что наиболее сильными протективными свойствами обладают антитела к С-концевому участку R-домена фрагмента В, препятствующие связыванию ДТ с рецепторами клеток-мишеней [100]. Кроме того, антитела к петле 188-201, соединяющей фрагменты А и В между собой, также способны нейтрализовать цитотоксичность ДТ, очевидно, предотвращая протеолитическую активацию токсина [101]. Антитела к активному центру фрагмента А блокируют действие токсина внутри клетки, но не способны предотвратить связывание ДТ со специфичными рецепторами [100].

Противодифтерийная антитоксическая сыворотка лошадей, которая применяется при лечении дифтерии, содержит высокоаффинные $F(ab')_2$ -фрагменты антител лошади против ДТ и обладает достаточной протективностью, но зачастую вызывает аллергические реакции, особенно при повторных введениях. Одним из способов снижения аллергенности и иммуногенности терапевтических антител является уменьшение их молекулярной массы или их гуманизация – перенос с помощью методов генной инженерии регионов антител

животных, определяющих их комплементарность к антигенам, в структуру антител человека. Сейчас активно изучаются возможности использования в качестве токсиннейтрализующих агентов моноклональных человеческих антител, гуманизированных антител животных, рекомбинантных scFv-антител, имеющих массу 25-35 кДа [102], а также наноантител верблюда, состоящих из одного вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина с молекулярной массой около 15 кДа [103]. Низкомолекулярные scFv-антитела – как моно-, так и мультивалентные, все шире используются в экспериментальной и клинической медицине при болезни Паркинсона [104], при болезни Альцгеймера [105], при СПИД [106], для выявления антигенов вируса энцефалита [107], токсина В *Clostridium difficile* [108], токсина скорпиона *Androctonus australis* [109] и других антигенов. Мы использовали нетоксичные рекомбинантные фрагменты ДТ для иммунизации животных с целью создания библиотеки иммуноглобулиновых генов, а также для селекции из этой библиотеки специфических фагов и получения антитоксических scFv-антител [110]. Такие рекомбинантные антитела могут использоваться в тест-системах для выявления ДТ и, возможно, в качестве токсиннейтрализующих агентов.

8. Вакцины против дифтерии и других инфекционных заболеваний на основе рекомбинантных производных ДТ.

Рекомбинантные производные ДТ, лишенные токсических свойств либо способности к проникновению в клетку, могут использоваться в составе противодифтерийных вакцин нового поколения, а также в качестве носителей в составе вакцин против других инфекционных заболеваний. Одним из самых распространенных токсидов в составе противодифтерийных вакцин является CRM197, который отличается от ДТ всего одной аминокислотной заменой (Gly52Glu) в каталитическом домене [29]. Несмотря на то, что CRM197 немного уступает анатоксину по иммуногенности вследствие влияния аминокислотной замены на конформацию фрагмента В [111, 112], он широко используется в вакцинах и предлагается для интраназальной противодифтерийной ревакцинации взрослого населения [113]. В составе вакцин также применяется нетоксичный дифтерийный токсид CRM228 [28] и не способные связываться с рецептором токсиды CRM9 [114] и CRM45 [29].

Для повышения иммуногенности мутантных форм ДТ используют различные подходы: увеличение положительного заряда с помощью модификации этилендиамином [115], перекрестное сшивание молекул токсидов или генно-инженерное слияние нескольких копий его фрагмента [116], а также экспрессию дифтерийных токсидов или их фрагментов в клетках ослабленных стафилококков [117], стрептококков [118], сальмонелл [119],

микобактерий [120] или на капсидах вируса гриппа [121], что не только усиливает иммуногенность дифтерийных токсоидов, но и вызывает иммунный ответ против других инфекционных агентов. Для экспонирования на поверхности бактериальных клеток или вирусных капсидов фрагмент мутантного дифтерийного токсоида генетически сливают с поверхностным белковым антигеном ослабленного штамма возбудителя. Введение такой живой вакцины вызывает иммунный ответ, который усиливается со временем за счет длительной персистенции бактерий или вирусов в организме [118]. Для экспонирования на клетках бактерий или капсидах вирусов выбирают как полноразмерные токсоиды [121], так и их различные фрагменты (фрагмент А [116], фрагмент В [121], R-домен фрагмента В [117]).

Наиболее иммуногенные участки полипептидной цепи ДТ, которые могут быть использованы при создании вакцин, представлены на рис. 4 [122-127]. Большинство В- и Т-эпитопов ДТ входят в структуру В-фрагмента ДТ, что объясняет его сильные иммуногенные свойства по сравнению с А-фрагментом ДТ [128]. В-эпитопы ДТ, как правило, входят в состав участков, экспонированных на поверхности молекулы токсина. Основными Т-эпитопами ДТ являются участки фрагмента В, которые также принимают непосредственное участие в транслокации фрагмента А через мембрану эндосомы в цитозоль.

В качестве адъювантов для вакцин нового поколения часто используют ADP-рибозилирующие белковые бактериальные токсины и их фрагменты [129], например холерный токсин [130] или его фрагмент В [131], фрагмент С столбнячного токсина [116], частично нетоксичные мутанты LTR72, LTK63 и LTR192G термолabileного энтеротоксина *Escherichia coli* [132]. Механизм адъювантного действия бактериальных токсинов до конца неясен, однако известно, что стимулирование холерным токсином и термолabileным энтеротоксином *E. coli* созревания дендритных клеток опосредуется системой cAMP и зависит от наличия каталитической активности у этих токсинов [133].

Большинство современных исследований в области разработки вакцин направлены на создание сложных схем иммунизации комбинированными (мультивалентными) вакцинами, которые давали бы защиту от многих инфекций [134]. В комбинированных вакцинах дифтерийные токсоиды (CRM197, CRM9, CRM228, CRMHis21Gly и др.) и их фрагменты, благодаря выраженным иммуногенным свойствам [135], используются, как правило, в качестве носителей для слабоиммуногенных антигенов (олигосахаридов, пептидов и т.д.) различных возбудителей. Их применяют, например, для усиления иммунитета против возбудителей малярии [136], коклюша [137], полиомиелита [138], менингококков [139], пневмококков [140], стрептококков [141], шигелл [142], бактерий *Haemophilus influenzae*

типа В [143], бактерий *Moraxella catarrhalis* [144], холерных вибрионов [145], патогенных грибов [146]. Некоторые мультивалентные конъюгированные вакцины на основе дифтерийного токсоида CRM197 уже используются в развитых странах для массовой иммунизации населения, например, вакцина Quattvaxem (Novartis Pharma, Швейцария) против дифтерии, коклюша, столбняка и *H. influenzae* типа В [147], а также вакцины против менингококков [148] и пневмококков [149].

Другим подходом в разработке вакцин является генно-инженерная замена одного из поверхностных эпитопов В-фрагмента ДТ на эпитоп другого белка, например антигена вируса полиомиелита [138] или главного внешнемембранного белка возбудителя менингита [150]. Некоторые синтетические вакцины вообще не имеют в своем составе носителя и состоят из конъюгированных между собой пептидных эпитопов белков различных возбудителей: ДТ, белка М стрептококка, поверхностного антигена гепатита В, белков паразитических плазмодиев [151]. Такие вакцины могут быть достаточно иммуногенны, и они часто не уступают по своей эффективности вакцинам с носителями [152].

Одним из важных направлений современной вакцинологии и биотехнологии является разработка методов получения дешевых рекомбинантных вакцин в бактериях и растениях. В 2007 г. получены рекомбинантные аналоги вакцины АКДС в *Escherichia coli* и томатах. Первый экспериментальный аналог вакцины АКДС представлял собой генетически слитый белок, содержащий иммунопротективную субъединицу S1 коклюшного токсина, полноразмерный нетоксичный дифтерийный токсид и фрагмент С столбнячного токсина [153]. Другой аналог АКДС был получен путем трансформации томатов с помощью агробактерий синтетическим геном, кодирующим 6 наиболее иммуногенных эпитопов коклюшного, дифтерийного и столбнячного токсинов, а также 2 адъювантных полипептида [154]. Альтернативным вариантом противодифтерийных вакцин могут быть ДНК-вакцины, которые способны вызывать синтез дифтерийного токсоида или белковых конструкций на его основе в трансфицированных клетках организма и стимулировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [155].

Необходимость создания новых вакцин обусловлена не только недостаточной эффективностью уже существующих, но и тем, что вакцины могут быть фактором эволюционного отбора патогенных микроорганизмов, который способен привести к повышению их вирулентности [156]. Современные рекомбинантные вакцины должны быть нетоксичными, высокоэффективными, не вызывать побочных эффектов, характерных для

традиционных вакцин, и не угнетать иммунный ответ на вакцины против других заболеваний.

Заключение

ДТ известен человечеству свыше ста лет и является одним из наиболее изученных белковых бактериальных токсинов. Поскольку фрагменты и отдельные домены его молекулы характеризуются узкой функциональной специализацией, ДТ оказался удобным объектом для создания на его основе с помощью методов белковой инженерии разнообразных конструкций с заданными свойствами.

На сегодняшний день генетически модифицированные токсиды и их фрагменты считаются более перспективными компонентами вакцин, чем химически модифицированные аналоги природных токсинов, поскольку они являются более дешевыми, достаточно иммуногенными и вызывают меньше осложнений при многократной вакцинации [157].

Несмотря на широкие перспективы практического применения рекомбинантных производных ДТ и его фрагментов, а также соответствующих им нуклеотидных последовательностей, существует ряд серьезных проблем, тормозящих развитие этого направления. Во-первых, в некоторых случаях промышленное получение рекомбинантных белков оказывается затрудненным из-за низкого уровня их экспрессии и неправильного фолдинга. Во-вторых, методы введения генно-инженерных конструкций в организм и их адресной доставки в клетки-мишени остаются недостаточно совершенными. В-третьих, введенные в организм белковые конструкторы подвержены действию протеолитических ферментов и вызывают синтез нейтрализующих антител, а ДНК-последовательности могут абортиться клетками и выводиться из организма. В-четвертых, мало изучены возможности возникновения побочных эффектов, обусловленных непредусмотренным взаимодействием с другими функционально-активными молекулами на поверхности и внутри клеток и случайным проникновением в здоровые клетки. Кроме того, использование цитотоксических конструкций на основе ДТ для лечения вирусных инфекций зачастую оказывается неэффективным из-за селекции инфицированных клеток, не экспрессирующих вирусные антигены на своей поверхности. В-пятых, регулирование уровня и длительности экспрессии ДНК-конструкций в клетках, как правило, невозможно, а последствия взаимодействия этих конструкций с геномом человека или других организмов при проникновении в окружающую экосистему непредсказуемы.

Тем не менее, рекомбинантные белки на основе ДТ легко модифицируются, что позволяет менять степень их токсичности, убирать последовательности, имеющие

перекрестную реактивность с неспецифичными рецепторами, устранять побочные эффекты, уменьшать иммуногенность и аллергенность, увеличивать резистентность к протеиназам и длительность циркуляции в организме, а также улучшать их способность проникать в ткани. Вышеперечисленные возможности совершенствования рекомбинантных конструкций и активное проведение исследований, направленных на решение существующих проблем, позволяют надеяться, что область применения рекомбинантных производных ДТ и их нуклеотидных последовательностей будет расширяться.

Список литературы:

1. *Jeljaszewicz I., Wadstrum T.* Bacterial Toxins and Cell Membranes. – L.& N.-Y.: Academic Press, 1978. 432 p.
2. *Pappenheimer A.M., Gill D.M.* // Science. 1973. V. 182. № 110. P. 353-358.
3. *Freeman V., Morse I.* // J. Bact. 1952. V. 63. № 3. P. 407-411.
4. *Falnes P.O., Ariansen S., Sandvig K., Olsnes S.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 6. P. 4363-4368.
5. *Schlessinger D., Schaechter M.* Bacterial toxins // Mechanisms of microbial disease. – Baltimore: Williams and Wilkins. 1993. P. 162-175.
6. *Uchida T., Pappenheimer A. M., Greany R.* // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 11. P. 3838-3844.
7. *Greenfield L., Bjorn M.J., Horn G., Fong D., Buck G.A., Collier R.J., Kaplan D.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1983. V. 80. № 22. P. 6853-6857.
8. *Buck G.A., Groman N.B.* // J. Bacteriol. 1981. V. 148. № 1. P. 131-142.
9. *Ratti G., Rappuoli R., Giannini G.* // Nucleic. Acids Res. 1983. V. 11. № 19. P. 6589-6595.
10. *Collier R.J.* // Bacteriol. Rev. 1975. V. 39. № 1. P. 54–85.
11. *Choe S., Bennett M.J., Fujii G., Curmi P.M., Kantardjieff K.A., Collier R.J., Eisenberg D.* // Nature. 1992. V. 357. № 6375. P. 216-222.
12. *Rolf J.M., Gaudin H.M., Eidels L.* // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 13. P. 7331-7337.
13. *Sandvig K., Olsnes S.* // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 17. P. 9068-9076.
14. *Honjo T., Nishizuka Y., Hayaishi O.* // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 12. P. 3553-3555.
15. *Duncan A.M., Heddle J.A.* // Cancer Lett. 1984. V. 23. № 3. P. 307-311.
16. *Shen W.H., Choe S., Eisenberg D., Collier R.J.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 46. P. 29077-29084.
17. *Tsuneoka M., Nakayama K., Hatsuzawa K., Komada M., Kitamura N., Mekada E.* // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 35. P. 26461-26465.
18. *Pappenheimer A.M.Jr.* // Ann. Rev. Biochem. 1977. № 46. P. 69-94.
19. *Chassaing A., Pichard S., Araye-Guet A., Barbier J., Forge V., Gillet D.* // FEBS J. 2011. V. 258. № 10.1111/j.1742-4658.2011.08053.x. [preprint].
20. *O'Keefe D.O., Cabiaux V., Choe S., Eisenberg D., Collier R.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1992. V. 89. № 13. P. 6202-6206.
21. *Silverman J.A., Mindell J.A., Zhan H., Finkelstein A., Collier R.J.* // J. Membr. Biol. 1994. V. 137. № 1. P. 17-28.
22. *Lai B., Zhao G., London E.* // Biochemistry. 2008. V. 47. № 15. P. 4565-4574.

23. Rodnin M.V., Kyrychenko A., Kienker P., Sharma O., Posokhov Y.O., Collier R.J., Finkelstein A., Ladokhin A.S. // *J Mol Biol.* 2010. V. 402. № 1. P. 1-7.
24. Antignani A., Youle R.J. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. V. 105. № 23. P. 8020-8025.
25. Trujillo C., Taylor-Parker J., Harrison R., Murphy J.R. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 76. № 4. P. 1010–1019.
26. Bektaş M., Varol B., Nurten R., Bermek E. // *Cell Biochem Funct.* 2009. V. 27. № 7. P. 430-439.
27. Ratts R., Zeng H., Berg E.A., Blue C., McComb M.E., Costello C.E., vanderSpek J.C., Murphy J.R. // *J. Cell. Biol.* 2003. V. 160. № 7. P. 1139–1150.
28. Johnson V.G., Nicholls P.J. // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. № 15. P. 4766-4769.
29. Giannini G., Rappuoli R., Ratti G. // *Nucleic Acids Res.* 1984. V. 12. № 10. P. 4063-4069.
30. Bell C.E., Eisenberg D. // *Adv Exp Med Biol.* 1997. V. 419. P. 35-43.
31. Kahn K., Bruice T.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. № 48. P. 11960-11969.
32. Lodaya R., Blanke S.R., Collier R.J., Slama J.T. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. № 42. P. 13877-13886.
33. Oppenheimer N.J., Bodley J.W. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. № 16. P. 8579-8581.
34. Omura F., Kohno K., Uchida T. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 180. № 1. P. 1-8.
35. Parikh S.L., Schramm V.L. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. № 5. P. 1204–1212.
36. Yates S.P., Jørgensen R., Andersen G.R., Merrill A.R. // *Trends Biochem Sci.* 2006. V. 31. № 2. P. 123-133.
37. Davydova E.K., Ovchinnikov L.P. // *FEBS Lett.* 1990. V. 261. № 2. P. 350-352.
38. Tang S., He W.J., Xu H. Liu W.Y., Ruan K.C. // *Mol. Cell. Biochem.* 2001. V. 223. № 1-2. P. 117-121.
39. Stenmark H., Moskaug J.O., Madshus I.H., Sandvig K., Olsnes S. // *J. Cell Biol.* 1991. V. 113. № 5. P. 1025-1032.
40. Madshus I.H., Olsnes S., Stenmark H. // *Infect. Immun.* 1992. V. 60. № 8. P. 3296-3302.
41. Liu X.H., Castelli J.C., Youle R.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999. V. 96. № 17. P. 9563-9567.
42. Shaw C.A., Starnbach M.N. // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. № 2. P. 1001-1008.
43. Arora N., Leppla S.H. // *Infect. Immun.* 1994. V. 62. № 11. P. 4955-4961.
44. McGraw T.E., Greenfield L., Maxfield F.R. // *J. Cell Biol.* 1987. V. 105. № 1. P. 207-214.
45. Naglich J.G., Metherall J.E., Russell D.W., Eidels L. // *Cell.* 1992. V. 69. № 6. P. 1051-1061.

46. Кабернюк А.А., Лабинцев А.Ю., Колибо Д.В., Олейник Е.С., Редчук Т.А., Короткевич Н.В., Горчев В.Ф., Карахим С.О., Комисаренко С.В. // Украинский биохимический журнал. 2009. V. 81. № 1 С. 67-77.
47. Das S.K., Wang X.N., Paria B.C., Damm D., Abraham J.A., Klagsbrun M., Andrews G.K., Dey S.K. // Development. 1994. V. 120. № 5. P. 1071-1083.
48. Marikovsky M., Breuing K., Liu P.Y., Eriksson E., Higashiyama S., Farber P., Abraham J., Klagsbrun M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. № 9. P. 3889-3893.
49. Jin K., Mao X.O., Sun Y., Xie L., Jin L., Nishi E., Klagsbrun M., Greenberg D.A. // J. Neurosci. 2002. V. 22. № 13. P. 5365-5373.
50. Kobrin M.S., Funatomi H., Friess H., Buchler M.W., Stathis P., Korc M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. V. 202. № 3. P. 1705-1709.
51. Miyagawa J., Higashiyama S., Kawata S., Inui Y., Tamura S., Yamamoto K., Nishida M., Nakamura T., Yamashita S., Matsuzawa Y. // J. Clin. Invest. 1995. V. 95. № 1. P. 404-411.
52. Mitamura T., Higashiyama S., Taniguchi N., Klagsbrun M., Mekada E. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. № 3. P. 1015-1019.
53. Miyamoto S., Yagi H., Yotsumoto F., Horiuchi S., Yoshizato T., Kawarabayashi T., Kuroki M., Mekada E. // Anticancer Res. 2007. V. 27. № 6A. P. 3713-3721.
54. Короткевич Н.В., Лабинцев А.Ю., Кабернюк А.А., Олейник Е.С., Романюк С.И., Колибо Д.В., Комисаренко С.В. // Украинский биохимический журнал. 2009. V. 81. № 4. С. 69-80.
55. Esbensen Q.Y., Falnes P.O., Olsnes S., Madshus I.H. // Biochem J. 1993. V. 294, Pt. 3. P. 663-666.
56. Cha J.H., Brooke J.S., Chang M.Y., Eidels L. // Infect. Immun. 2002. V. 70. № 5. P. 2344-2350.
57. Stoneman V., Braganza D., Figg N., Mercer J., Lang R., Goddard M., Bennett M. // Circ. Res. 2007. V. 100. № 6. P. 884-893.
58. Aguila H.L., Hershberger R.J., Weissman I.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1995. V. 92. № 22. P. 10192-10196.
59. Bennett C.L., van Rijn E., Jung S., Inaba K., Steinman R.M., Kapsenberg M.L., Clausen B.E. // J. Cell Biol. 2005. V. 169. № 4. P. 569-576.
60. Brockschneider D., Lappe-Siefke C., Goebbels S., Boesl M.R., Nave K.A., Riethmacher D. // Mol. Cell. Biol. 2004. V. 24. № 17. P. 7636-7642.
61. Testa U., Riccioni R., Biffoni M., Diverio D., Lo-Coco F., Foà R., Peschle C., Frankel A.E. // Blood. 2005. V. 106. № 7. P. 2527-2529.

62. *Wen Z.L., Tao X., Lakkis F., Kiyokawa T., Murphy J.R.* // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 19. P. 12289-12293.
63. *Greenfield L, Johnson VG, Youle RJ.* // Science. 1987. V. 238. № 4826. P. 536-539.
64. *Maxwell F., Maxwell I.H., Glode L.M.* // Mol. Cell. Biol. 1987. V. 7. № 4. P. 1576-1579.
65. *Williams D.P., Parker K., Bacha P., Bishai W., Borowski M., Genbauffe F., Strom T.B., Murphy J.R.* // Protein Eng. 1987. V. 1. № 6. P. 493-498.
66. *Talpur R., Apisarnthanarax N., Ward S., Duvic M.* // Leuk. Lymphoma. 2002. V. 43. № 1. P. 121-126.
67. *Miller D.D., Bach R.G., Tio F.O., Bailey S.R., Waters C.A., Woodworth T.G., Nichols J.C., Paige S.B., Farrar M.* // Atherosclerosis. 1996. V. 126. № 1. P. 1-14.
68. *Ramadan M.A., Gabr N.S., Bacha P., Günzler V., Phillips S.M.* // Cell Immunol. 1995. V. 166. № 2. P. 217-226.
69. *Phillips S.M., Bhopale M.K., Hilliard B., Zekavat S.A., Ali M.A., Rostami A.* // Cell Immunol. 2010. V. 261. № 2. P. 144-152.
70. *Dannull J., Su Z., Rizzieri D., Yang B.K., Coleman D., Yancey D., Zhang A., Dahm P., Chao N., Gilboa E., Vieweg J.* // J. Clin. Invest. 2005. V. 115. № 12. P. 3623-3633.
71. *Feuring-Buske M., Frankel A.E., Alexander R.L., Gerhard B., Hogge D.E.* // Cancer Res. 2002. V. 62. № 6. P. 1730-1736.
72. *Sweeney E.B., Foss F.M., Murphy J.R., vanderSpek J.C.* // Bioconjug. Chem. 1998. V. 9. № 2. P. 201-207.
73. *Jabara H.H., Vercelli D., Schneider L.C., Williams D.P., Genbauffe F.S., Poisson L.R., Waters C.A., Geha R.S.* // J. Allergy Clin. Immunol. 1995. V. 95. № 4. P. 893-900.
74. *Cai J., Zheng T., Murphy J., Waters C.A., Lin G.Y., Gill P.S.* // Invest. New Drugs. 1997. V. 15. № 4. P. 279-287.
75. *Li C., Hall W.A., Jin N., Todhunter D.A., Panoskaltsis-Mortari A., Vallera D.A.* // Protein Eng. 2002. V. 15. № 5. P. 419-427.
76. *Frankel A.E., Powell B.L., Hall P.D., Case L.D., Kreitman R.J.* // Clin. Cancer Res. 2002. V. 8. № 5. P. 1004-1013.
77. *Hotz H.G., Gill P.S., Masood R., Hotz B., Buhr H.J., Foitzik T., Hines O.J., Reber H.A.* // J. Gastrointest. Surg. 2002. V. 6. № 2. P. 159-166.
78. *Hagihara N., Walbridge S., Olson A.W., Oldfield E.H., Youle R.J.* // Cancer Res. 2000. V. 60. № 2. P. 230-234.

79. *Murphy J.R., Bishai W., Borowski M., Miyanochara A., Boyd J., Nagle S.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1986. V. 83. № 21. P. 8258-8262.
80. *Pickering J.G., Bacha P.A., Weir L., Jekanowski J., Nichols J.C., Isner J.M.* // J. Clin. Invest. 1993. V. 91. № 2. P. 724-729.
81. *Weetall M., Digan M.E., Hugo R., Mathew S., Hopf C., Tart-Risher N., Zhang J., Shi V., Fu F., Hammond-McKibben D., West S., Brack R., Brinkmann V., Bergman R., Neville D. Jr., Lake P.* // Transplantation. 2002. V. 73. № 10. P. 1658-1666.
82. *Knechtle S.J.* // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2001. V. 356. № 1409. P. 681-689.
83. *Demidem A., Lam T., Alas S., Hariharan K., Hanna N., Bonavida B.* // Cancer Biother. Radiopharm. 1997. V. 12. № 3. P. 177-186.
84. *Monaco M.E., Mack J., Dugan M.D., Ceriani R.* // Ann. NY Acad. Sci. 1986. № 464. P. 389-399.
85. *Chaudhary V.K., Gallo M.G., FitzGerald D.J., Pastan I.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1990. V. 87. № 23. P. 9491-9494.
86. *Van Oijen M.G., Preijers F.W.* // J. Drug Target. 1998. V. 5. № 2. P. 75-91.
87. *Aullo P., Alcamì J., Popoff M.R., Klatzmann D.R., Murphy J.R., Boquet P.* // EMBO J. 1992. V. 11. № 2. P. 575-583.
88. *Mizuguchi H., Nakanishi T., Nakanishi M., Nakagawa T., Nakagawa S., Mayumi T.* // Cancer Lett. 1996. V. 100. № 1-2. P. 63-69.
89. *Anderson D.G., Peng W., Akinc A., Hossain N., Kohn A., Padera R., Langer R., Sawicki J.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2004. V. 101. № 45. P. 16028-16033.
90. *Fogar P., Navaglia F., Basso D., Zambon C.F., Moserle L., Indraccolo S., Stranges A., Greco E., Fadi E., Padoan A., Pantano G., Sanzari M.C., Pedrazzoli S., Montecucco C., Plebani M.* // Cancer Gene Ther. 2010. V. 17. № 1. P. 58-68.
91. *Maxwell I.H., Glode L.M., Maxwell F.* // Leuk. Lymphoma. 1992. V. 7. № 5-6. P. 457-462.
92. *Vallera D.A., Jin N., Baldrice J.M., Panoskaltsis-Mortari A., Chen S.Y., Blazar B.R.* // Cancer Res. 2000. V. 60. № 4. P. 976-984.
93. *Banda N.K., Akkina R.K., Terrell K., Shpall E.J., Tomczak J., Campaign J., Claman H., Cagle L., Harrison G.S.* // J. Hematother. 1998. V. 7. № 4. P. 319-331.
94. *Czako M., An G.* // Plant. Physiol. 1991. V. 95. № 3. P. 687-692.
95. *Воробьев А.А., Васильев Н.Н., Кравченко А.Т.* Анатоксины. М.: Медицина, 1965. 488 с.
96. *Rittenberg M.B., Pinney C.T.Jr., Iglewski B.H.* // Infect. Immun. 1976. V. 14. № 1. P. 122-128.

97. Кабернюк А.А., Олейник Е.С., Редчук Т.А., Романюк С.И., Колибо Д.В., Комисаренко С.В. // Доклады Национальной академии наук Украины. 2008. № 3. С. 160-166.
98. Романюк С.И., Колибо Д.В., Кавун Э.М., Радавский Ю.Л., Ткаченко Т.Ю., Крамарев С.А., Комисаренко С.В. // Украинский биохимический журнал. 2001. V. 73. № 6. С. 73-76.
99. Кабернюк А.А., Олейник Е.С., Редчук Т.А., Романюк С.И., Колибо Д.В., Евтушенко В.В., Головач О.В., Крамарев С.А., Комисаренко С.В. // Наука и инновация. 2008. V. 4. № 3. С. 22-31.
100. Hayakawa S., Uchida T., Mekada E., Moynihan M.R., Okada Y. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 7. P. 4311-4317.
101. Audibert F., Jolivet M., Chedid L., Alouf J.E., Boquet P., Rivaille P., Siffert O. // Nature. 1981. V. 289. № 5798. P. 593-594.
102. Hoogenboom H.R., Marks J.D., Griffiths A.D., Winter G. // Immunology Reviews. 1992. № 130. P. 41-68.
103. Vincke C., Loris R., Saerens D., Martinez-Rodriguez S., Muyltermans S., Conrath K. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. № 5. P. 3273-3284.
104. Emadi S., Liu R., Yuan B., Schulz P., McAllister C., Lyubchenko Y., Messer A., Sierks M.R. // Biochemistry. 2004. V. 43. № 10. P.2871-2878.
105. Manoutcharian K., Acero G., Munguia M.E., Montero J.A., Govezensky T., Cao C., Ugen K., Gevorkian G. // J. Neuroimmunol. 2003. V. 145. № 1-2. P.12-17.
106. Kempf E., Weiss E., Klein P., Glacet A., Spratt S., Bourel D., Orfanoudakis G. // Molecular Biotechnology. 2001. V. 17. № 2. P.97-108.
107. Hu W.G., Thompson H.G., Alvi A.Z., Nagata L.P., Suresh M.R., Fulton R.E. // Journal of Immunological Methods. 2004. V. 289. № 1-2. P. 27-35.
108. Deng X.K., Nesbit L.A., Morrow K.J.Jr. // Journal Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2003. V. 10. № 4. P. 587-595.
109. Aubrey N., Devaux C., Billiald P. // Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique. 2002. V. 95. № 3. P. 194-196.
110. Олейник Е.С., Кабернюк А.А., Буркалева Д.А. Романюк С.И., Колибо Д.В., Шепеляковская А.О., Ламан А.Г., Комисаренко С.В. // Украинский биохимический журнал. 2007. V. 79. № 5. С. 91-97.
111. Gupta R.K., Collier R.J., Rappuoli R., Siber G.R. // Vaccine. 1997. V. 15. № 12-13. P. 1341-1343.

112. *Bigio M., Rossi R., Nucci D., Antoni G., Rappuoli R., Ratti G.* // FEBS Lett. 1987. V. 218. № 2. P. 271-276.
113. *McNeela E.A., O'Connor D., Jabbal-Gill I., Illum L., Davis S.S., Pizza M., Peppoloni S., Rappuoli R., Mills K.H.* // Vaccine. 2000. V. 19. № 9-10. P. 1188-1198.
114. *Hu V.W., Holmes R.K.* // Biochim. Biophys. Acta. 1987. V. 902. № 1. P. 24-30.
115. *Farmer J.L., Roberts L.A., Rydzinski M.E., Hilty M.D.* // Cell Immunol. 1993. V. 146. № 1. P. 186-197.
116. *Miyaji E.N., Mazzantini R.P., Dias W.O. Nascimento A.L., Marcovistz R., Matos D.S., Raw I., Winter N., Gicquel B., Rappuoli R., Leite L.C.* // Infect. Immun. 2001. V. 69. № 2. P. 869-874.
117. *Fromen-Romano C., Drevet P., Robert A., Ménez A., Léonetti M.* // Infect. Immun. 1999. V. 67. № 10. P. 5007-5011.
118. *Lee C.W., Lee S.F., Halperin S.A.* // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 8. P. 4569-4574.
119. *Orr N., Galen J.E., Levine M.M.* // Infect. Immun. 1999. V. 67. № 8. P. 4290-4294.
120. *Zurbriggen R., Gluck R.* // Vaccine. 1999. V. 17. № 11-12. P. 1301-1305.
121. *Lee C.W., Halperin S.A., Morris A., Lee S.F.* // Can. J. Microbiol. 2005. V. 51. № 10. P. 841-846.
122. *Triebel F., Autran B., De Roquefeuil S., Falmagne P., Debré P.* // Eur. J. Immunol. 1986. V. 16. № 1. P. 47-53.
123. *Zucker D.R., Murphy J.R., Pappenheimer A.M.Jr.* // Mol. Immunol. 1984. V. 21. № 9. P. 795-800.
124. *Sesardic D., Khan V., Corbel M.J.* // J. Gen. Microbiol. 1992. V. 138. № 10. P. 2197-2203.
125. *Raju R., Navaneetham D., Okita D., Diethelm-Okita B., McCormick D., Conti-Fine B.M.* // Eur. J. Immunol. 1995. V. 25. № 12. P. 3207-3214.
126. *Diethelm-Okita B.M., Okita D.K., Banaszak L., Conti-Fine B.M.* // J. Infect. Dis. 2000. V. 181. № 3. P. 1001-1009.
127. *Rolf J.M., Eidels L.* // Infect. Immun. 1993. V. 61. № 3. P. 994-1003.
128. *Кабернюк А.А., Олейник Е.С., Колибо Д.В., Комисаренко С.В.* // Украинский биохимический журнал. 2009. V. 81. № 3 С. 92-101.
129. *Glenn G.M., Scharton-Kersten T., Vassell R., Matyas G.R., Alving C.R.* // Infect. Immun. 1999. V. 67. № 3. P. 1100-1106.

130. *Stickings P., Peyre M., Coombes L., Muller S., Rappuoli R., Del Giudice G., Partidos C.D., Sesardic D.* // *Infect. Immun.* 2008. V. 76. № 4. P. 1766-1773.
131. *Isaka M., Komiya T., Takahashi M., Yasuda Y., Taniguchi T., Zhao Y., Matano K., Matsui H., Maeyama J., Morokuma K., Ohkuma K., Goto N., Tochikubo K.* // *Vaccine.* 2004. V. 22. № 23-24. P. 3061-3068.
132. *Scharton-Kersten T., Yu J., Vassell R., O'Hagan D., Alving C.R., Glenn G.M.* // *Infect. Immun.* 2000. V. 68. № 9. P. 5306-5313.
133. *Bagley K.C., Abdelwahab S.F., Tuskan R.G., Fouts T.R., Lewis G.K.* // *Infect Immun.* 2002. V. 70. № 10. P. 5533-5539.
134. *West D.J., Rabalais G.P., Watson B., Keyserling H.L., Matthews H., Hesley T.M.* // *BioDrugs.* 2001. V. 15. № 6. P. 413-418.
135. *Kelly D.F., Snape M.D., Clutterbuck E.A., Green S., Snowden C., Diggle L., Yu L.M., Borkowski A., Moxon E.R., Pollard A.J.* // *Blood.* 2006. V. 108. № 8. P. 2642-2647.
136. *Jones G.L., Spencer L., Mollard R., Saul A.* // *Immunol. Lett.* 1990. V. 26. № 3. P. 285-290.
137. *Barbieri J.T., Armellini D., Molkentin J., Rappuoli R.* // *Infect. Immun.* 1992. V. 60. № 12. P. 5071-5077.
138. *Phalipon A., Crainic R., Kaczorek M.* // *Vaccine.* 1989. V. 7. № 2. P. 132-136.
139. *Harrison L.H.* // *JAMA.* 2008. V. 299. № 2. P. 217-219.
140. *Benaisa-Trouw B., Lefeber D.J., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F., Kraaijeveld K., Snippe H.* // *Infect. Immun.* 2001. V. 69. № 7. P. 4698-4701.
141. *Schulze K., Olive C., Ebensen T., Guzmán C.A.* // *Vaccine.* 2006. V. 24. № 35-36. P. 6088-6095.
142. *Passwell J.H., Harlev E., Ashkenazi S., Chu C., Miron D., Ramon R., Farzan N., Shiloach J., Bryla D.A., Majadly F., Roberson R., Robbins J.B., Schneerson R.* // *Infect. Immun.* 2001. V. 69. № 3. P. 1351-1357.
143. *Enioutina E.Y., Visic D., McGee Z.A., Daynes R.A.* // *Vaccine.* 1999. V. 17. № 23-24. P. 3050-3064.
144. *Yu S., Gu X.X.* // *Infect. Immun.* 2007. V. 75. № 6. P. 2974-2980.
145. *Kossaczka Z., Shiloach J., Johnson V., Taylor D.N., Finkelstein R.A., Robbins J.B., Szu S.C.* // *Infect. Immun.* 2000. V. 68. № 9. P. 5037-5043.
146. *Torosantucci A., Bromuro C., Chiani P., De Bernardis F., Berti F., Galli C., Norelli F., Bellucci C., Polonelli L., Costantino P., Rappuoli R., Cassone A.* // *J. Exp. Med.* 2005. V. 202. № 5. P. 597-606.

147. *Tamm E., Veronese A., Contorni M., Meriste S., Nacci P., Viviani S. // Vaccine. 2005. V. 23. № 14. P. 1715-1719.*
148. *Dagan R., Poolman J.T., Zepp F. // Expert Rev. Vaccines. 2008. V. 7. № 1. P. 97-115.*
149. *Eick A., Croll J., Weatherholtz R., Croll L., Santosham M. // Vaccine. 2004. V. 22. № 9-10. P. 1260-1264.*
150. *Johnson N., Pickett M.A., Watt P.J., Clarke I.N., Heckels J.E. // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 146. № 1. P. 91-96.*
151. *Jolivet M., Lise L., Gras-Masse H., Tartar A., Audibert F., Chedid L. // Vaccine. 1990. V. 8. № 1. P. 35-40.*
152. *Sela M., Arnon R., Jacob C.O. // Ciba Found Symp. 1986. № 119. P. 184-199.*
153. *Aminian M., Sivam S., Lee C.W., Halperin S.A., Lee S.F. // Protein Expr. Purif. 2007. V. 51. № 2. P. 170-178.*
154. *Soria-Guerra R.E., Rosales-Mendoza S., Márquez-Mercado C., López-Revilla R., Castillo-Collazo R., Alpuche-Solís A.G. // Plant Cell Rep. 2007. V. 26. № 7. P. 961-968.*
155. *Stoecklinger A., Grieshuber I., Scheibhofer S., Weiss R., Ritter U., Kissenpfennig A., Malissen B., Romani N., Koch F., Ferreira F., Thalhamer J., Hammerl P. // J. Immunol. 2007. V. 179. № 2. P. 886-893.*
156. *Gandon S., Mackinnon M.J., Nee S., Read A.F. // Nature. 2001. V. 414. № 6865. P. 751-756.*
157. *Robbins J.B., Schneerson R., Trollfors B., Sato H., Sato Y., Rappuoli R., Keith J.M. // J. Infect. Dis. 2005. V. 191. № 1. P. 81-88.*

Подписи к рисункам:

Рис. 1. Области применения рекомбинантных производных ДТ.

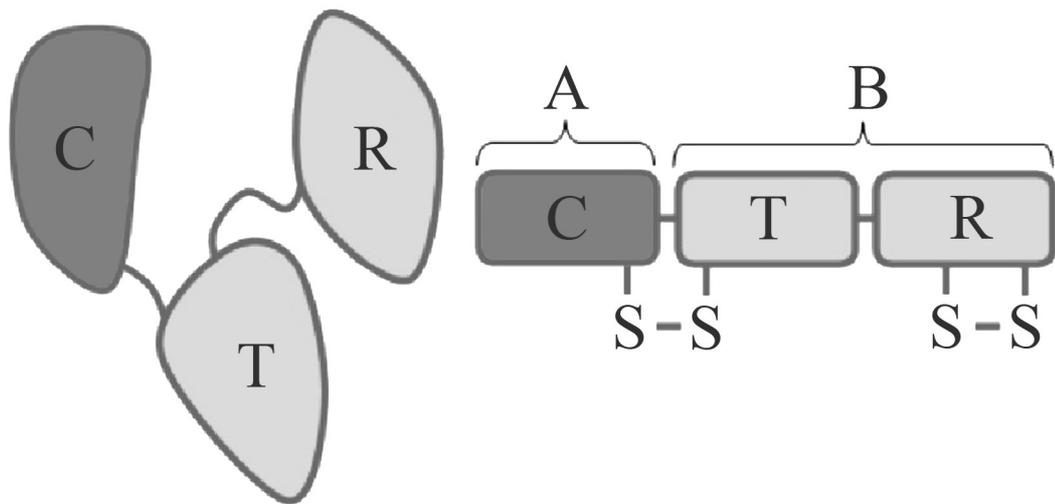
Рис. 2. Схема доменной структуры ДТ. С – каталитический домен, Т – трансмембранный домен, R – рецепторсвязывающий домен, А – фрагмент А, В – фрагмент В, -S-S- – дисульфидные связи.

Рис. 3. Структурные элементы молекулы ДТ, особенно важные для реализации каталитической, транспортной и рецепторсвязывающей функций токсина.

Рис. 4. Антигенная структура дифтерийного токсина (ДТ) (по данным [122-127]).
Пространственное расположение Т-эпитопов (а) и В-эпитопов (б) в молекуле ДТ (Т-эпитопы выделены темно-серым цветом, В-эпитопы – черным цветом); (в) – линейное расположение Т-эпитопов (вверху) и В-эпитопов (внизу) в аминокислотной последовательности ДТ. С – каталитический домен, Т – трансмембранный домен, R – рецепторсвязывающий домен ДТ.



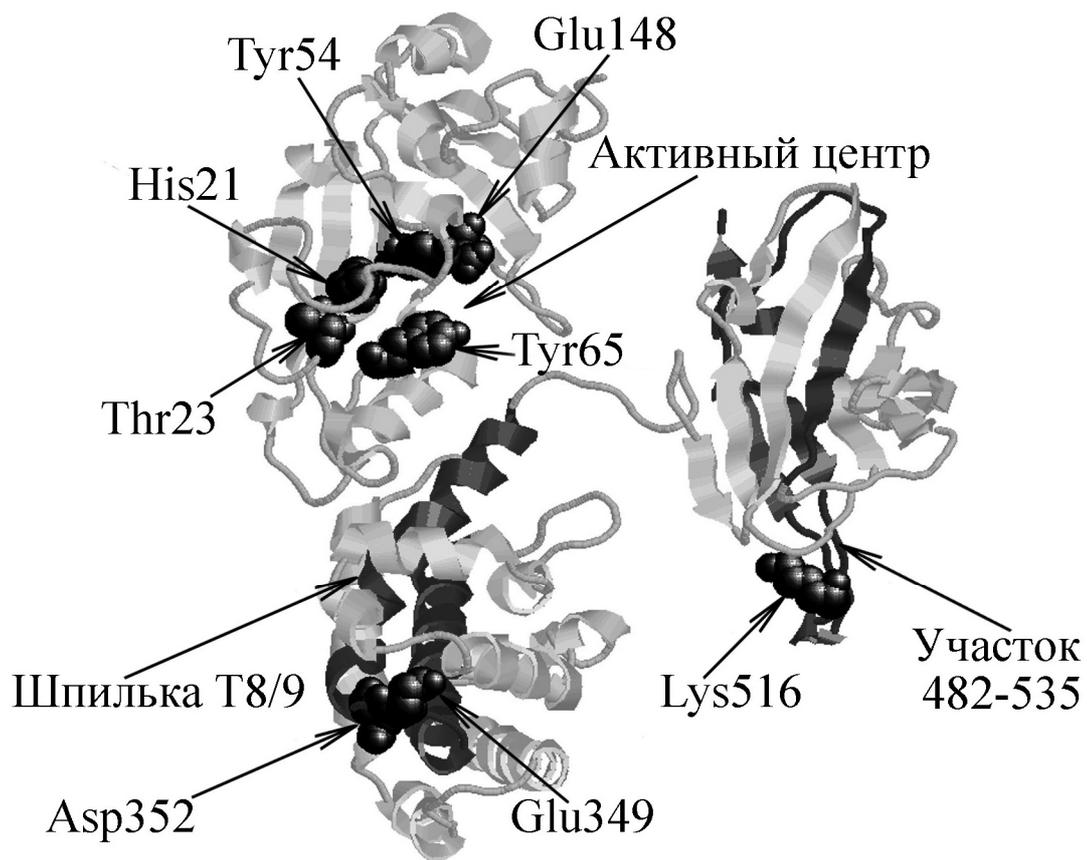
«Биоорганическая химия», Романюк С.И., рис. 1.



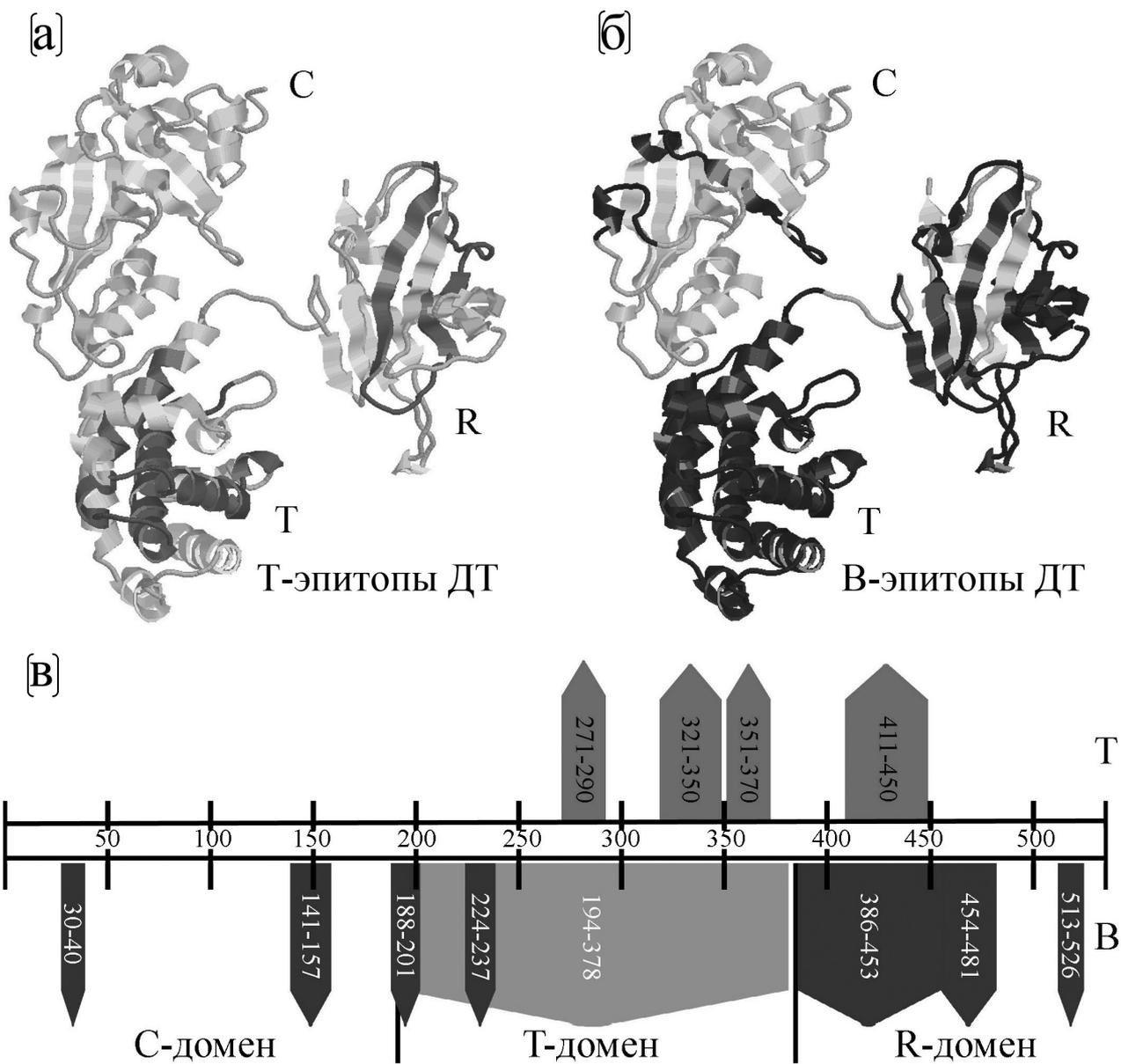
Биоорган. химия

Романюк

Рис. 2



«Биоорганическая химия», Романюк С.И., рис. 3.



«Биоорганическая химия», Романюк С.И., рис. 4.

Perspectives of Application of Recombinant Diphtheria Toxin Derivatives

S. I. Romaniuk, D. V. Kolybo, S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kiev

e-mail: sirparnas@gmail.com

Diphtheria toxin (DT) is a unique bacterial protein, which selectively kills certain cell populations due to strict functional specialization of domains that allows using this toxin in protein engineering for constructing recombinant derivatives with defined properties. The article covers structural and functional features of DT molecule, both fundamental and practical aspects of recombinant DT derivatives' applications in different fields. In particular, applications of recombinant DT derivatives as unique instruments for fundamental research of cell receptors' functions, mechanism of DT action and participation of different cell populations in biological processes are presented. Perspectives of recombinant DT derivatives practical applications for the development of vaccines, cytotoxins, HB-EGF blockers, diagnostic test-systems, serotherapeutic medications and constructions for drug delivery have been discussed. This review reflects recent advances and current problems in using recombinant DT derivatives for treatment and prophylaxis of oncologic, autoimmune, infectious and others diseases.

Key words: diphtheria toxin, diphtheria toxin fragments and domains, recombinant proteins, HB-EGF, vaccines, cytotoxins