

УДК 616-055.5/7-092]-085

Коллектив авторов

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ.

ЛАЗАРЕВ В.Н., ГОВОРУН В.М., АЛЕКСАНДРОВА Н.М., ЛОПУХИН Ю.М.

Научно-исследовательский институт физико-химической медицины
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Россия, 119828, Москва, ул. Малая Пироговская, д.1а, Тел.: (095)245-42-36
Факс: (095)246-45-01

Генная терапия хронических инфекционных заболеваний урогенитального тракта является новым перспективным направлением в современной биологии и медицине. В данном обзоре обсуждается новое направление в терапии урогенитальных инфекций, вызываемых микоплазмами: ингибирование микоплазменной инфекции после введения в клетки рекомбинантных плазмидных векторов, экспрессирующих гены цитотоксических пептидов.

Ключевые слова: цитотоксические пептиды, мелитин, *Mycoplasma*, генная терапия.

Одним из самых значительных событий последнего десятилетия в области естественных наук стало формирование новой дисциплины, родившейся на стыке молекулярной биологии, генной инженерии и медицины и получившей название генной терапии.

Генная терапия подразумевает лечебный подход, основанный на введении в организм больного рекомбинантного генетического материала с целью стабильной модификации клеток-мишеней [1]. С каждым годом увеличивается число работ, связанных с разработкой генотерапевтических способов лечения наследственных, опухолевых и инфекционных заболеваний, в связи с чем генную терапию можно по праву назвать медициной 21-го столетия.

В данной работе мы рассмотрим современное состояние генной терапии инфекционных заболеваний, в частности, инфекций урогенитального тракта и обсудим возможности использования цитотоксических пептидов в качестве потенциальных генотерапевтических агентов этих заболеваний.

Исследования, посвященные генной терапии инфекционных заболеваний можно условно разделить на три основные группы в соответствии с применяемыми агентами [2]:

- 1) нуклеиновые кислоты: антисенс-молекулы ДНК и РНК, РНК-ловушки, каталитически активные РНК (рибозимы).
- 2) протеины: трансдоминантные негативные белки, одноцепочечные антитела;
- 3) иммунотерапия: ДНК-вакцины и антиген-презентирующие клетки.

Следует отметить, что эффективность генно-терапевтических мероприятий складывается из нескольких составляющих факторов: а) выбора оптимальной мишени (в качестве которой могут выступать отдельные клетки или ткань); б) выбора максимально эффективной системы доставки генетического материала; в) уровня экспрессии, возможности регулирования экспрессии и стабильности генотерапевтического агента(ов).

В настоящее время опубликовано множество исследований, связанных с разработкой подходов к генной терапии различных инфекционных заболеваний.

Наибольшее число работ посвящено подавлению инфекции вируса иммунодефицита человека с применением самого широкого спектра современных генотерапевтических агентов: антисенс-транскриптов вирусных генов [3], рибозимов [4], трансдоминантных негативных белков [5], ДНК-вакцин [6]. Помимо вируса иммунодефицита человека, объектами для генной терапии стали вирус гепатита В [7], гепатита С [8], вирус гриппа [9], цитомегаловирус [10], микобактерии [11].

Заметим, однако, что практические успехи генной терапии еще довольно скромны, и пока не описано ни одно заболевание, полностью излеченное с ее помощью. Что же касается генной терапии хронических инфекций урогенитального тракта, вызванных, в частности, микроорганизмами из рода *Mycoplasma* (класс *Mollicutes*), то такие исследования, несмотря на их безусловную значимость, в настоящее время практически не проводятся. С одной стороны, возможно, это связано с отсутствием сведений о молекулярных основах персистенции данных внутриклеточных паразитов. С другой стороны, нестабильность генома, уникальные механизмы генетической трансформации и, как следствие, высокая скорость мутационного процесса делают в большинстве случаев невозможным применение стандартных подходов для генной терапии этих инфекций.

Современное состояние генной терапии микоплазменных инфекций.

Подавление микоплазменных инфекций в настоящее время представляет довольно серьезную проблему. Многие микоплазмы являются возбудителями болезней человека, а также растений и животных. У человека они вызывают инфекции дыхательных путей, урогенитального тракта, артрит и аутоиммунные патологии, являются факторами активации вирусов, в том числе и ВИЧ [12]. Особое значение имеет внутриутробное инфицирование плода, приводящее к различным негативным последствиям [13].

В лечебной практике для терапии микоплазменных инфекций используются антибиотики широкого спектра действия (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны), однако их действие, вследствие быстрого приобретения резистентности к ним микоплазмами, в редких случаях эффективно. Кроме того, уникальные особенности взаимоотношений

«микоплазма-иммунная система» часто способствуют развитию персистенции микоплазм в организме [14].

В качестве возможных генотерапевтических агентов при микоплазменных инфекциях были предприняты попытки использования ДНК-вакцин. ДНК-вакцинация или генетическая иммунизация имеет несомненные преимущества перед классическими аттенуированными вакцинами: отсутствие риска инфекции, исключение адъюванта, носителя или денатурирующего агента. ДНК-вакцины эффективно индуцируют как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ.

Так, например, в качестве противомикоплазменной ДНК-вакцины была предложена экспрессирующая библиотека, состоящая из фрагментов ДНК *M. pulmonis*, клонированных в последний экзон гена, кодирующего гормон роста человека (hGH) [15]. Продукт экспрессии был секретлируемым, а в качестве вектора использовался цитомегаловирус. Другой оригинальный вариант ДНК-вакцины [16] представлял собой химерный белок, состоящий из β -галактозидазы и R2-субъединицы рибонуклеотидредуктазы *M. hyopneumoniae*. В качестве вектора авторы использовали аттенуированный штамм *Salmonella typhimurium* (*aroA*). В обоих случаях проводили экспериментальное заражение соответствующими штаммами микоплазм после введения одной из экспрессирующих конструкций и регистрировали защитный эффект на мышах и свиньях.

Несомненно, что одно из самых современных направлений в генной терапии, а именно генетическая вакцинация, открывает широкие возможности для профилактики многих инфекционных заболеваний и имеет определенные преимущества перед аттенуированными вакцинами. Однако, вопрос о целесообразности применения ДНК-вакцин для профилактики микоплазменных инфекций остается спорным. Это связано, во-первых, с чрезвычайной антигенной вариабельностью микоплазм [17], во-вторых, минимальное количество шаперон-кодирующих генов, участвующих в секреции протеинов, утрата сигнальной пептидазы типа I и периплазматического пространства затрудняют «заякоривание» белков на поверхности микоплазм, что позволяет последним «ускользать» от надзора иммунной системы [18,14]. Вследствие этих причин, генетическая вакцинация против микоплазменных инфекций вряд ли найдет широкое практическое применение.

Другим фактором, лимитирующим развитие исследований в области генной терапии микоплазменных инфекций, является отсутствие эффективных клонирующих и челночных векторов для микоплазм. Следует отметить, что попытки создания подобных векторов предпринимались. Так, например, в экспериментах по трансфекции *S. citri* репликативной формой вируса спироплазм SpV1, несущего вставку части гена, кодирующего P1-адгезин *M. pneumoniae*, наблюдалась экспрессия этого гена в спироплазме [19]. Другой тип клонирующего вектора был сконструирован путем комбинирования гена *oriC* из *S. citri* с геном *tetM* [20]. Эта конструкция вводилась методом электропорации в *S. citri*, где находилась в свободной экстрахромосомальной форме и реплицировалась. Однако, после нескольких пассажей *S. citri* эта конструкция интегрировалась в хромосому спироплазм.

Все сконструированные к настоящему времени челночные вектора для микоплазм обладают низкой копийностью и способны к спонтанной интеграции в геном, поэтому создание специфичных высококопийных векторов представляется весьма актуальной задачей.

Цитотоксические пептиды.

Альтернативным подходом к решению проблемы генной терапии хронических урогенитальных инфекций, на наш взгляд, может стать применение цитотоксических пептидов.

Природные цитотоксические пептиды (цитолитические токсины, амфипатические пептиды) являются неотъемлемой частью любого организма (от грибов до позвоночных) и выполняют роль либо «наступательного», либо «оборонительного» оружия организма. Часто эти пептиды называют «прямыми литическими факторами», в отличие от токсинов, имеющих ферментативную активность, например, токсических фосфолипаз [21]. В настоящее время идентифицировано несколько семейств цитотоксических пептидов. К ним, в частности, относятся: β -гемолизин, выделенный из *Staphylococcus aureus* [22], мелитин, выделенный из пчелиного яда [23], маганин, выделенный из кожи лягушки [24], и другие.

Биологическую активность пептидов связывают со способностью принимать α -спиральную структуру, которая амфипатична и формирует ионные каналы в бислое мембран, позволяющие выходить ионам по градиенту концентрации [25]. Однако, существует и альтернативная гипотеза механизма действия таких пептидов, согласно которой, пептиды образуют кластеры на поверхности мембраны, что приводит к повышению ее проницаемости (так называемый «эффект ковра») [26].

Цитотоксические пептиды постепенно занимают свою нишу в практической медицине в качестве антимикробных агентов. Так, компания «Magainin Pharmaceuticals» провела клинические испытания одного из вариантов маганина, который использовался при лечении язвы нижних конечностей полимикробной этиологии у 926 пациентов. Лечебный эффект оказался сравним с таковым при оральном применении офлоксацина, однако при применении маганина не наблюдалось никаких побочных эффектов. Успешно прошли клинические испытания: 1) низина (бактериальный антибиотик) при лечении язв ротовой полости, вызванных *Helicobacter pylori*; 2) протегрина при лечении инфекции, вызванной метициллин-устойчивым штаммом *S. aureus* [27]; индолицидина при лечении инфекций, вызванных грибами *Aspergillus* [28].

Антимикробное действие амфипатических пептидов аламетицина, цекропина, мелитина, глобимицина, грамицидина, маганина, валиномицина было также показано на нескольких штаммах микоплазм [29]. В этой работе изучено влияние этих пептидов на изменение роста и морфологии микоплазм, на липопротеиновый процессинг и мембранный потенциал клеток. Интересно, что микоплазмы оказались менее чувствительны к цекропину и маганину, выделенным из животных, и более чувствительны к мелитину и грамицидину, выделенным соответственно из пчелиного яда и бактерий. Это исследование наглядно доказывает перспективность использования цитотоксических пептидов при лечении микоплазменных инфекций.

Если говорить о селективном действии цитотоксических пептидов, то весьма интересным может оказаться использование так называемых «бактерицидных белков, увеличивающих проницаемость мембран», или ВРІ-белков (bactericidal/permeability-increasing protein). Эти белки были найдены в азурофильных гранулах полиморфноядерных лейкоцитов [30]. Механизм их действия заключается в связывании с внешним липополисахаридным слоем

мембран грамотрицательных бактерий, что в свою очередь ведет к увеличению проницаемости мембраны и к гибели клетки [31]. Таким образом, цитотоксичность этого белка будет направлена только на грамотрицательные бактерии и L-формы грамположительных бактерий.

Исследования по изучению влияния действия ВРІ-белка на микоплазмы уже проводятся [32]. При добавлении этого белка к культуре *Acholeplasma laidlawii* наблюдается заметное ингибирование роста клеток. Заметим, что цитотоксическим действием обладал не только нативный белок, выделенный из лейкоцитов, но и рекомбинантный N-концевой фрагмент, состоящий из первых 199 аминокислот этого белка.

Недавно появилось сообщение [33], что помимо антимикробного действия, некоторые цитотоксические пептиды обладают еще и противоопухолевой активностью. Экспрессирующие конструкции, несущие в своем составе гены цекропина и мелитина, были трансфицированы в клетки опухоли мочевого пузыря. Туморогенность полученных клонов анализировали на «голых» мышах. Результаты исследований показали, что отдельные клоны клеток полностью потеряли свою опухоленность. Эти данные позволяют надеяться, что гены цитотоксических пептидов в составе экспрессирующих векторов могут в перспективе использоваться и для генной терапии опухолевых заболеваний.

Мелитин в генной терапии урогенитальных инфекций

В лаборатории генной инженерии и иммуногенетики Научно-исследовательского института физико-химической медицины разрабатываются альтернативные подходы к генной терапии хронических инфекционных заболеваний урогенитального тракта, вызванных, в частности, микоплазмами и хламидиями, с использованием цитотоксических пептидов. Следует отметить, что наша работа по использованию в качестве антимикробных агентов не химически синтезированных пептидов, а их искусственных генов, находящихся под контролем различных регуляторных элементов, является, по-существу, новаторской в этой области исследований.

В наших исследованиях использован один из амфипатических пептидов, наиболее изученных с точки зрения структуры и механизма действия – мелитин. Мелитин представляет собой основной белок, состоящий из 26 аминокислот. При высоких концентрациях мелитин вызывает лизис мембран, при сублитических – образует ионные каналы в липидном бислое клетки [34]. Выбор нами мелитина в качестве антимикоплазменного агента обусловлен несколькими причинами. Мелитин обладает активностью в линейной форме, то есть не требует посттрансляционной модификации. Кроме того, изменив триплет TGG, кодирующий триптофан на триплет TGA, который только у микоплазм кодирует аминокислоту триптофан, тогда как для всех других организмов является стоп-кодоном, можно ожидать, что мелитин будет оказывать цитотоксическое действие только на клетки микоплазм.

С другой стороны мы предполагаем, что лизис клеток и разрушение микоплазм при действии мелитина в составе экспрессирующего вектора *in vivo*, возможно, будет оказывать определенный стимулирующий эффект на иммунную систему, что, несомненно важно, в силу особенностей взаимоотношений «микоплазма-иммунная система».

На первом этапе исследований нами были сконструированы плазмидные векторы, в которых ген мелитина находится под контролем раннего промотора

цитомегаловируса человека (HCMV) и показана экспрессия мелитина в клетках линий HeLa и 293. На следующем этапе, в эти конструкции была введена нуклеотидная последовательность, кодирующая точку начала репликации генома вируса SV40. Такие векторы способны к репликации в клетках эукариот, трансформированных Т-антигеном вируса SV-40, что позволило нам получить гиперэкспрессию мелитина в клетках COS-1. Проведены первые эксперименты по ингибированию инфекции *M. hominis* в клетках линий HeLa, COS-1 после трансфекции клеточных линий полученными конструкциями.

При использовании генов цитотоксических пептидов в составе экспрессирующих генетических конструкций, особое значение приобретает контроль за уровнем экспрессии этих пептидов в клетке. С этой целью мы сконструировали плазмидные векторы, в которых ген мелитина находился под контролем индуцибельного тетрациклин-зависимого промотора. В этом случае индукция экспрессии мелитина будет зависеть от присутствия («On-система») или отсутствия («Off-система») тетрациклина (доксидоциклина) в питательной среде клеток, трансфицированных данными конструкциями. В контрольных экспериментах ген мелитина был заменен маркерным геном GFP (green fluorescent protein). Мы получили пятидесятикратное увеличение экспрессии маркерного гена по сравнению с конструкциями, содержащими HCMV-промотор и строгое регулирование уровня экспрессии в зависимости от дозы тетрациклина. По нашему мнению, такая система регулирования экспрессии весьма перспективна при использовании плазмидных векторов, несущих в своем составе гены цитотоксических пептидов.

Ген мелитина был клонирован также в плазмидный вектор, который содержит конъюгативный транспозон *Tn916* с геном устойчивости к тетрациклину (*tetM*). Методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции была показана экспрессия мелитина в клетках *Acholeplasma laidlawii* и *Mycoplasma hominis* после введения этой конструкции методом электропорации.

Для определения цитотоксической активности мелитина в отношении *A. laidlawii* и *M. hominis* были проведены опыты по трансформации этих микоплазм различными количествами экспрессирующего вектора. Мы показали ингибирование размножения микоплазм и зависимость этого эффекта от количества введенной рекомбинантной плазмиды.

Необходимо отметить, что искусственный ген мелитина в составе плазмидного вектора, используемого в опытах по ингибированию роста микоплазм, содержал в своей последовательности триплет TGA, который у микоплазм кодирует аминокислоту триптофан, а у эукариотических клеток является стоп-кодоном. В этом случае мы можем говорить о возможном избирательном действии мелитина на микоплазмы и весьма серьезный вопрос о селективном действии цитотоксических пептидов при использовании их как антимикробных генотерапевтических агентов в перспективе нами может быть решен.

Кроме того, мы планируем провести опыты по изучению иммуногенности полученных генетических конструкций в опытах по бласт-трансформации.

В заключение заметим, что недавно появившиеся расшифровки полных нуклеотидных последовательностей геномов двух микоплазм – *M. pneumoniae* и *M. genitalium* [35,18] вместо простой картины минимального количества генов, принесли только новые вопросы, в том числе и касающиеся обнаружения у

микоплазм фрагментов метаболических путей, характерных для более сложноорганизованных организмов. Возможно, в силу этого, методы генной терапии микоплазменных инфекций в перспективе могут полярно отличаться от методов, применяемых сегодня для генотерапии других инфекционных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hannania E.G., Kavanagh J., Hortobagyi G., Gilles R.E., Champlin R., Deisseroth, A.B.* (1995) *Am. J. Med.*, **99**, 537-552.
2. *Bunnell B.A., Morgan R.A.* (1998) *Clin.Mic.Rev.*, **11**, 42-56.
3. *VandenDriessche T., Chuah M.K., Chiang L., Chang H.K., Ensoli B., Morgan R.A.* (1995) *J. Virol.*, **69**, 4045-4052.
4. *Zhou C., Bahner I., Rossi J.J., Kohn D.B.* (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **6**, 17-24.
5. *Bahner I.C., Zhou C., Yu X.J., Hao Q.L., J.C. Guatelli, Kohn D.B.* (1993) *J. Virol.*, **67**, 3199-3207.
6. *Lu S., Santoro J.S., Fuller D.H., Haynes J.R., Robinson H.L.* (1995) *Virology*, **209**, 147-154.
7. *Davis H.L., McCluskie M.J., Gerin J.L., Purcell R.H.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7213-7218.
8. *Lieber A., He C.Y., Polyak S.J., Gretch D.R., Barr D., Kay M.A.* (1996) *J. Virol.*, **70**, 8782-8791.
9. *Lazarev V.N., Schmarov M.M., Zakhartchouk A.N., Yurov G.K., Misurina O.U., Akopian T.A., Grinenko N.F., Grodnitskaya N.A., Kaverin N.V., Naroditsky B.S.* (1999) *Antiviral Research.*, **42**, 47-57.
10. *Pari G.S., Field A.K., Smith J.A.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 1157-1161.
11. *Tascon R.E., Colston M.J., Ragno S., Stavropolous E., Gregory D., Lowrie D.B.* (1996) *Nat. Med.*, **2**, 888-892.
12. *Lo S.-C.* (1992) In: *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis* (Maniloff J., ed.), ASM, Washington, pp.549-559.
13. *Прозоровский С.В., Раковская И.В., Вульфович Ю.В.* (1995) *Медицинская микоплазмология. Медицина, Москва.*
14. *Razin S., Yogev D., Naot Y.* (1998) *Mic. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1094-1156.
15. *Barry M.A., Lai W.C., Johnston S.A.* (1995) *Nature*, **377**, 632-635.
16. *Fagan P.K., Djordjevic S.P., Eamens G.J., Walker M.J.* (1997) *Infect. Immun.*, **65**, 2502-2507.
17. *Swanson J., Belland R. J., Kirsebom L.A.* (1994) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2**, 805-811.
18. *Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkel E., Li B.-C., Herrmann R.* (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4420-4449.
19. *Marias A., Bove J.M., Dallo S.F., Baseman J.B., Renaudin J.* (1993) *J. Bacteriol.*, **175**, 2783-2787.
20. *Renaudin J., Marias A., Verdin E., Duret S., Foissac X., Laigret F., Razin A.* (1995) *J. Bacteriol.*, **177**, 2870-2877.
21. *Kini R.M., Evans H.J.* (1989) *Int. J. Pept. Protein Res.*, **34**, 277.
22. *Freer J.H.* (1986) In: *Natural Toxins* (Harris J.B. ed.), Clarendon Press. Oxford.

23. *Habermann E.* (1972) *Science*, **177**, 314.
24. *Bevins C.L. and Zasloff M.* (1990) *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 395.
25. *Bechinger B.* (1997) *J. Membr. Biol.*, **156**, 197-211.
26. *Shai Y.* (1995) *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 460-464.
27. *Steinberg D. et al.* (1997) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 1738-1742.
28. *Ahmad I., Perkins W.R., Lupan D.M., Selsted M.E., Janoff A.S.* (1995) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1237**, 109-114.
29. *Beven L. and Wroblewski H.* (1997) *Res. Microbiol. Institut Pasteur/Elsevier*, **148**, 163-175.
30. *Elsbach P. and Weiss J.* (1993) *Immunobiology*, **187**, 417-429.
31. *Mannion B.A., Weiss J., Elsbach P.* (1990) *J. Clin. Investig.*, **85**, 853-860.
32. *Horwitz A.H., Williams R.E., Liu P.-S., Nadell R.* (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2314-2316.
33. *Winder D., Gunzburg W.H., Erfle V., Salmons B.* (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 608-612.
34. *Cornut I., Thiaudiere E., Dufourcq J.* (1993) In: *Protein folding* (Erand R. ed.), CRC Press, 173-219.
35. *Fraser C.M., Yocayne J.D., White O. et al.* (1995) *Science*, **270**, 397-403.

Поступила 25.03.00.

GENE THERAPY OF CHRONIC INFECTIOUS DISEASES OF UROGENITAL TRACT WITH CYTOTOXIC PEPTIDES

LAZAREV V.N., GOVORUN V.M., ALEXANDROVA N.M., PARFENOVA T.M.,
LOPUKHIN YU.M.

Institute of Physico-Chemical Medicine

Russia, 119828, Moscow, Malaya Pirigovskaya st., 1a Tel.: (095)245-42-36
Fax: (095)246-45-01

Gene therapy of chronic infectious diseases of urogenital tract represents a new perspective field in the modern biological and medical sciences. In the review discuss one of the new directions in gene therapy of urogenital infections caused by *Mycoplasma*: inhibition of mycoplasmal infection after administration of recombinant plasmid vectors, expressed the genes of cytotoxic peptides.

Key words: cytotoxic peptides, melittin, *Mycoplasma*, gene therapy.