

УДК 576.893.192.6; 577.218
© Коллектив авторов

**ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ ШТАММОВ
PLASMODIUM BERGHEI, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ХЛОРОХИНУ, С ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ,
СООТВЕТСТВУЮЩИМИ РЕГУЛЯТОРНЫМ ЭЛЕМЕНТАМ ГЕНА
МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ**

Т.Г. Панкова*, Т.М. Игониная, В.Ф. Кобзев, Т.И. Меркулова

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10; тел.: (383)333-39-10;
факс: (383)333-12-78; эл. почта: pankt@yandex.ru.

С помощью метода “задержки” ДНК-пробы в геле в ядерных экстрактах малярийного паразита грызунов *Plasmodium berghei* (*P. berghei*) впервые выявлены белки, специфически связывающиеся с двуцепочечными олигонуклеотидами, воспроизводящими сайты связывания факторов транскрипции семейства AP1, а также NF-IL6 и SP1, участвующих в повышении экспрессии гена множественной лекарственной устойчивости (*mdr1*) человека, и с олигонуклеотидом, соответствующим элементу, ответственному за стимуляцию сывороткой крови (SRE). У штаммов *P. berghei* с различной чувствительностью к хлорохину наблюдаются различия в картинах связывания ядерных белков с использованными олигонуклеотидами. Внесение мутаций в консенсусные последовательности AP1 и NF-IL6 сайтов, а также в SRE приводило к нарушению связывания некоторых белков, что говорит о наличии у малярийного паразита ядерных белков, ДНК-связывающие домены которых имеют большое сходство с ДНК-связывающими доменами транскрипционных факторов NF-IL6, SRF1 и представителей AP1 семейства. При этом белки, имеющие сходство с SRF1 и AP1, а также один из близких к NF-IL6 белков проявляют большую ДНК-связывающую активность у хлорохинрезистентных штаммов. Полученные результаты свидетельствуют о серьезных изменениях, произошедших в регуляторном аппарате плазмодия при селекции его на хлорохиноустойчивость.

Ключевые слова: *P. berghei*, хлорохинрезистентность, транскрипционные факторы, олигодезоксирибонуклеотиды, метод “задержки” в геле.

ВВЕДЕНИЕ. Возбудитель малярии - одноклеточный эукариотический паразит эритроцитов, геном которого проявляет большую пластичность, обеспечивая развитие устойчивости практически к любому использованному против него лекарственному препарату, является прекрасным объектом для изучения механизмов формирования лекарственной устойчивости. Распространение штаммов малярийного паразита, устойчивых к хлорохину, широко применяемому с 40-х годов для лечения малярийной инфекции, а впоследствии и к другим антималярийным средствам, возникновение и распространение штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) обусловили в последние годы огромную волну заболеваемости малярией в мире. В связи с этим на первый план выдвигается задача преодоления лекарственной устойчивости малярийного паразита. В рамках этой задачи большое значение имеет выяснение механизмов хлорохиноустойчивости, т.к. хлорохин до сих пор остается первым в ряду лекарств при выборе тактики лечения малярии из-за его эффективности, малой токсичности и дешевизны.

* - адресат для переписки

Известно, что гибель малярийного паразита происходит из-за образования комплекса хлорохина с токсической гемовой частью гемоглобина в пищеварительной вакуоли плазмодия при его переваривании малярийным паразитом, в результате чего нарушается процесс детоксикации в организме плазмодия, происходит его отравление и гибель. Хлорохиноустойчивый паразит разрешает проблему токсичности, уменьшая в 40-50 раз аккумуляцию хлорохина в вакуоли [1], и это дает возможность предполагать связь хлорохиноустойчивого фенотипа с генами, ответственными за накопление хлорохина в клетках плазмодия. Ранее нами на *Plasmodium berghei* (*P. berghei*) [2] и Ndifor с соавт. на *Plasmodium falciparum* (*P. falc.*) [3] было показано, что у малярийных паразитов, устойчивых к хлорохину, значительно повышена активность цитохром Р450-зависимых микросомальных монооксигеназ – ферментов, метаболизирующих и инактивирующих лекарства, в том числе и хлорохин. Нами было обнаружено, что геном малярийного паразита содержит гены, кодирующие цитохром Р450, и количество соответствующих транскриптов выше у устойчивых штаммов по сравнению с чувствительным [4]. Однако, уже ранние генетические исследования указывали на мультигенную природу хлорохиноустойчивости [5]. В настоящее время обнаружены ещё два гена плазмодия, связанные с хлорохинорезистентностью: *mdr1* (ген множественной лекарственной устойчивости) и *crt* (ген, кодирующий хлорохинорезистентный транспортер) [6, 7]. Продукты этих генов – трансмембранные транспортные белки: Pgh1 (гомолог 1 Р-гликопротеина млекопитающих у плазмодия) и CRT (хлорохинорезистентный транспортер) локализованы на мембране пищеварительной вакуоли плазмодия и осуществляют вывод хлорохина из плазмодия [8, 9].

Имеющиеся данные об увеличении транскрипционной активности генов цитохрома Р450, *mdr1* и *crt* [4, 10-12] в связи с развитием устойчивости к хлорохину, а также способность хлорохина наряду с активацией *mdr1* гена увеличивать количество транскриптов ряда неопознанных локусов генома [13] дают возможность думать, что под действием этого препарата могут изменяться содержание или активность факторов, являющихся общими регуляторами для всех этих генов. Известно, что основными факторами регуляции экспрессии генов эукариот служат ДНК-связывающие белки (факторы транскрипции), взаимодействующие с регуляторными участками эффекторных генов. Регуляторные области Р-450, *mdr1* и *crt* генов плазмодия пока не исследованы, но регуляторные области *mdr1* генов млекопитающих уже достаточно хорошо изучены. Эти области содержат сайты связывания факторов транскрипции AP1, NF-IL6, SP1 [14-16]. Исходя из этого и принимая во внимание высокую эволюционную консервативность факторов транскрипции (в особенности их ДНК-связывающих доменов), можно предполагать, что сходные белки стимулируют транскрипцию гена *mdr1* и у плазмодия. С целью выяснения вопроса о наличии у малярийного паразита таких белков и их возможной роли в формировании устойчивости к хлорохину мы изучили связывание ядерных белков, выделенных из штаммов плазмодия с различной устойчивостью к хлорохину, с олигонуклеотидами, соответствующими сайтам связывания вышеуказанных транскрипционных факторов.

МЕТОДИКА. В работе использовали [α - 32 P] dATP ("Amersham", Англия); фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I ("СибЭнзим", Новосибирск); C 14 -гипоксантин ("Изотоп" Санкт-Петербург); HEPES ("ICN", США); хлорохин дифосфат ("Serva", ФРГ); NP-40, PMSF ("Fluka" США). Остальные реактивы фирм "Sigma", "Serva" и отечественного производства квалификации "осч". Лабораторные штаммы малярийного паразита грызунов *P. berghei* были полученные из Института медицинской паразитологии и тропической медицины (ИМПитМ), Москва: 1) чувствительный к хлорохину штамм N; 2) штамм LNK-65 со спонтанно пониженной в 2-3 раза чувствительностью к хлорохину; 3) линия LNK-65 ChIR, селекционированная на высокую устойчивость к хлорохину в ИМПитМ С.А. Рабинович путем длительного поддержания родительского штамма LNK-65

на мышах, которым вводили возрастающие дозы хлорохина [17]. Кровь зараженных животных хранили в жидком азоте, используя в качестве криопротектора диметилсульфоксид, смешивая равные объемы крови и 20% диметилсульфоксида. Во время экспериментов штаммы *P. berghei* поддерживали на белых беспородных мышах (возраст 1,5-2 месяца, вес 18-20 г.) путём внутрибрюшинных перевивок зараженной крови. Устойчивость к хлорохину линии LNK-65 ChlR поддерживали пероральным введением мышам хлорохина в дозе 450 мг/кг при развившейся паразитемии. Эта доза хлорохина не оказывала противомаларийного эффекта, что свидетельствует о сохранившемся уровне устойчивости паразита. Доза хлорохина, подавляющая развитие чувствительного штамма, составляет 50 мг/кг. В опытах использовали кровь зараженных мышей следующего пассажа, которым хлорохин не вводили. Развитие паразитемии в крови зараженных животных контролировали микроскопически с помощью приготовления тонких мазков крови, окрашенных азури-эозином по Романовскому-Гимза.

Для определения хлорохиноустойчивости в короткоживущей культуре *P. berghei* брали кровь зараженных мышей с паразитемией около 3% (2-3 день развития инфекции), когда паразиты, присутствующие в крови, находятся, в основном, на начальных стадиях внутриэритроцитарного развития. К 200 мкл суспензии зараженных эритроцитов в RPMI-1640, доведенной до 2% гематокрита и 2% паразитемии, добавляли HEPES (4,57 г/л), гентамицин (25 мкг/мл), 10% эмбриональную телячью сыворотку, C^{14} -гипоксантин (1 мкКи) и хлорохин в конечных концентрациях 10^{-8} - 10^{-4} М. Пробы инкубировали 22 часа при 37° в атмосфере 3% CO_2 , 1% O_2 и 96% N_2 . Клетки собирали на фильтры GF-A ("Whatman"), промывали, высушивали и измеряли радиоактивность [18]. Величиной, характеризующей степень ингибирования, служила концентрация хлорохина, соответствующая 50% торможению включения гипоксантина в нуклеиновые кислоты плазмодия (IC_{50}).

Ядерные экстракты выделяли из крови зараженных мышей с паразитемией 40-60%. Кровь очищали от лейкоцитов, дважды пропуская ее через колонку с микрокристаллической целлюлозой ЛК ("Chemapol", Чехия). Очищенные от лейкоцитов зараженные эритроциты дважды лизировали 0,01% (масса/объем) сапонином. При такой обработке паразит сохраняется, тогда как все форменные элементы крови разрушаются и удаляются. Из осажденных паразитов белки ядер выделяли по [19] с модификациями: $(3-9) \times 10^8$ паразитов, выделенных из эритроцитов 2-3-х зараженных мышей ресуспендировали в 1 мл лизирующего буфера: 10 mM HEPES, pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF. Суспензию клеток оставляли на 15 минут на льду, после чего к пробам добавляли NP-40 до 0,65% и 10 секунд перемешивали на Vortex. Гомогенат центрифугировали 30 секунд при 14000 g на холоду. Осадок ядер ресуспендировали в 50-100 мкл экстрагирующего буфера: 25 mM HEPES, pH 7,9; 0,4 M NaCl; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF, 10% глицерина. Пробы 15 минут интенсивно встряхивали на льду и центрифугировали 5 минут при 14000 g. Аналогичным образом получали ядерные экстракты из форменных элементов крови. Ядерные экстракты в концентрации 3-10 мкг белка в мкл замораживали в аликвотах при -70°C. При выделении ядерных экстрактов малярийного паразита проводили микроскопический контроль чистоты паразита и ядер.

Олигонуклеотиды, соответствующие обеим цепям участков связывания факторов транскрипции, и их мутантные аналоги:

NF-IL6 – 5'-cagtTTCAACCTGTTTCGCGAGTTTCTCGAGGAATCA-3' [15],

NF-IL6м – 5'-cagtTTCAACCTGGACTAGCTTTTCTCGAGGAATCA-3';

AP1 – 5'-cagtAGCTTGATGAGTCAGCCGGATC-3' [20],

AP1м – 5'-cagtAGCTTGATGAGTTGGCCGGATC-3';

SP1 – 5'-cagtCGACTCTAGGCGGGGTAAAGTT CT-3' [20],

SP1м -5'-cagtCGACTCTATTCTTTTAAAGTT CT-3';

SRE – 5'-cagtACAGGATGTCCATATTAGGACATCTGCGT-3' [20],

SREм - 5'-cagtACAGGATGTCCATATTATACATCTGCGT-3' синтезировали

на автоматическом синтезаторе АСМ-102U (“Биоссет”, Новосибирск) Н-фосфатным методом и очищали с помощью электрофореза в 12% денатурирующем ПААГ, как описано в [20] (строчными буквами обозначены выступающие концы; подчеркнуты участки, соответствующие консенсусам сайтов связывания, двойной чертой подчеркнуты мутации). Мутации были внесены в соответствии с рекомендациями фирмы “Santa Cruz Biotechnology, ICN”, производящей пары олигонуклеотид/мутантный аналог. После отжига олигонуклеотиды метили с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$. Связывание белков экстрактов ядер с мечеными олигонуклеотидами изучали методом торможения в геле [20]. Реакционная смесь (14 мкл) содержала: 25 мМ HEPES, pH 7,6; 50-80 мМ NaCl; 0,1 мМ EDTA; 1 мМ ДТТ; 10% глицерин; 3 нг меченого олигонуклеотида; 8 мкг белка ядерного экстракта. После инкубации при 20°C в течение 10 минут смесь подвергали электрофорезу в 5% ПААГ в 0,5×ТБЕ буфере. Для получения демонстрационных автографов использовали приполимеризованные к стеклу гели, которые после высушивания экспонировали с рентгеновской пленкой при -70°C до двух недель.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полученные нами из ИМПитМ штаммы *P. berghei* используются в лаборатории около 15 лет, периодически подвергаясь замораживанию в жидком азоте и перевивкам, причем в случае линии NK-65 ChlR в присутствии пресса хлорохина. Мы дополнительно контролировали штаммы на чувствительность к хлорохину *in vitro*. На рисунке 1 представлены данные по сравнительному изучению ингибирования хлорохином включения C^{14} -гипоксантина (предпочтительного предшественника синтеза нуклеиновых кислот у плазмодия) в короткоживущих культурах эритроцитов мышей, зараженных штаммами *P. berghei* с различной чувствительностью к этому препарату. IC_{50} нормального хлорохинчувствительного штамма *P. berghei* равнялась $16,9 \pm 0,9$ нг/мл или $3,2 \times 10^{-8}$ М. Для штамма *P. berghei* LNK-65 со спонтанно сниженной чувствительностью к хлорохину IC_{50} составила $36,8 \pm 0,74$ нг/мл. Для 50% ингибирования включения $[\text{C}^{14}]$ -гипоксантина в культуре эритроцитов, зараженных высокорезистентной к хлорохину линией LNK-65 ChlR, потребовались концентрации хлорохина более, чем на 2 порядка превышающие IC_{50} для исходного штамма LNK-65 – 5012 ± 130 нг/мл. Это отражает чрезвычайно высокий уровень устойчивости к препарату этой линии, полученной в результате длительного воздействия селективного пресса хлорохина.

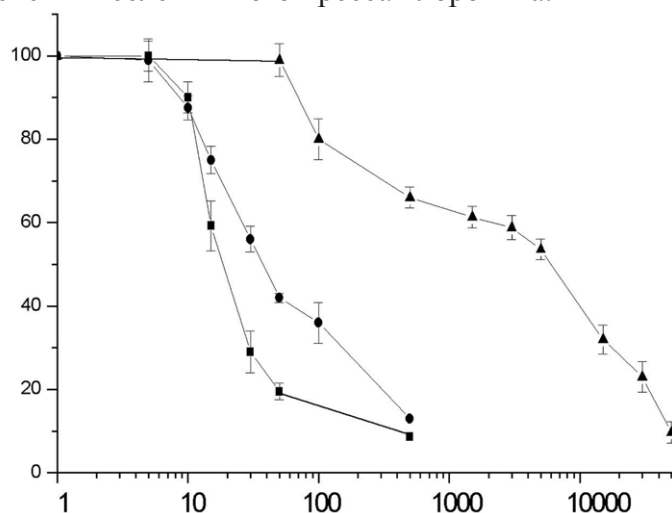


Рисунок 1.

Сравнительная активность хлорохина *in vitro* в отношении штаммов *P. berghei*, различающихся по чувствительности к этому препарату *in vivo*. По оси абсцисс – концентрация хлорохин дифосфата (нг/мл) в инкубационной пробе; по оси ординат – включение $[\text{C}^{14}]$ -гипоксантина (в процентах по отношению к необработанному контролю). -■- штамм N, чувствительный к хлорохину; -●- штамм LNK-65 со спонтанно пониженной чувствительностью к хлорохину; -▲- штамм LNK-65 ChlR, селекционированный на высокую устойчивость к хлорохину.

Мы предположили, что штаммы *P. berghei* с различной чувствительностью к хлорохину, могут отличаться по содержанию или активности ядерных белковых факторов, участвующих в регуляции транскрипции генов, ответственных за хлорохиноустойчивость. Известно, что для регуляции транскрипции *mdr1* гена млекопитающих существенное значение имеют белки семейства AP1. Промотор *mdr1* гена человека содержит неканоническую последовательность 5'-TCAGTCA-3' (-121/-115 п.н.), опознаваемую транскрипционными факторами этого семейства. На примере MCF-7 клеток с МЛУ отмечена четкая корреляция повышенной ДНК-связывающей активности Jun/Jun гомодимеров с резистентностью к лекарствам [14]. Уровень экспрессии *mdr1* гена повышает также транскрипционный фактор C/EBP β (NF-IL6). Опознаваемая этим фактором последовательность 5'-TTTCCCAGT-3' (-148/-140 п.н.) обнаружена в промоторном районе гена *mdr1* человека [15]. Кроме того в районах -61/-43 п.н., -78/-70 п.н. и -110/-103 п.н. 5'-фланкирующей области гена *mdr1* человека найдены сайты связывания фактора транскрипции SP1, стимулирующие активность этого гена, что показано в K13-8-5 клетках человека и Schneider 2 клетках дрозодилы [16].

В связи с этим мы исследовали связывание белков экстрактов ядер, выделенных из штаммов *P. berghei* с различной чувствительностью к хлорохину с олигонуклеотидами, воспроизводящими сайты связывания перечисленных факторов транскрипции. Кроме того, было исследовано связывание белков экстрактов ядер с SRE (serum response element) элементом, содержащим сайт связывания транскрипционного фактора SRF1, опосредствующим активацию сывороткой крови и быстрый ответ на ростовые факторы и митогены [21]. Как видно из рисунка 2 (А, Б) и рисунка 3 (А, Б) при использовании олигонуклеотидных зондов, соответствующих сайтам связывания для NF-IL6, AP1, SP1 и SRE, во всех трех штаммах *P. berghei* выявлены ядерные белки, специфически связывающиеся с данными сайтами. Наблюдаемое связывание не является результатом загрязнения ядерных белков плазмодия ядерными белками форменных элементов крови хозяина, чего можно было бы опасаться, так как плазмодий является внутриклеточным паразитом. Хотя при выделении клеток малярийного паразита из крови мышей мы освобождали зараженную кровь от лейкоцитов и других форменных элементов крови, возможность такого загрязнения нельзя было полностью исключить. Однако, как видно из представленных на рисунках 2 и 3 данных, картина связывания белков экстрактов ядер из форменных элементов крови со всеми использованными ДНК-зондами принципиально отличается от картины связывания ядерных белков малярийного паразита. При этом в картинах связывания белков экстрактов ядер, полученных из трёх штаммов *P. berghei*, наблюдаются существенные различия. Использование нами пары олигонуклеотид/мутация должно было помочь выяснить, какие из полос задержки специфически связаны с изучаемыми транскрипционными факторами и отсутствуют при использовании олигонуклеотидов с мутациями, нарушающими известные сайты связывания.

Как видно из рисунка 2А в случае сайта связывания NF-IL6 фактора для обоих резистентных штаммов характерно усиление полосы 4, которая исчезает при связывании тех же экстрактов с олигонуклеотидом, содержащим мутацию, повреждающую консенсусную последовательность NF-IL6. В этом случае исчезает также общая для всех штаммов полоса 5. Эти данные дают основания думать, что у плазмодия имеются два белка, ДНК-связывающие домены которых имеют большое сходство с ДНК-связывающим доменом NF-IL6, и один из этих белков активируется у устойчивых штаммов. Остальные полосы задержки формируются белками, очевидно, не имеющими ничего общего с NF-IL6, однако нельзя исключить, что некоторые из этих белков играют роль в формировании хлорохиноустойчивости, поскольку под действием хлорохина кроме *mdr1* гена изменяется регуляция ещё более 100 локусов генома плазмодия [13].

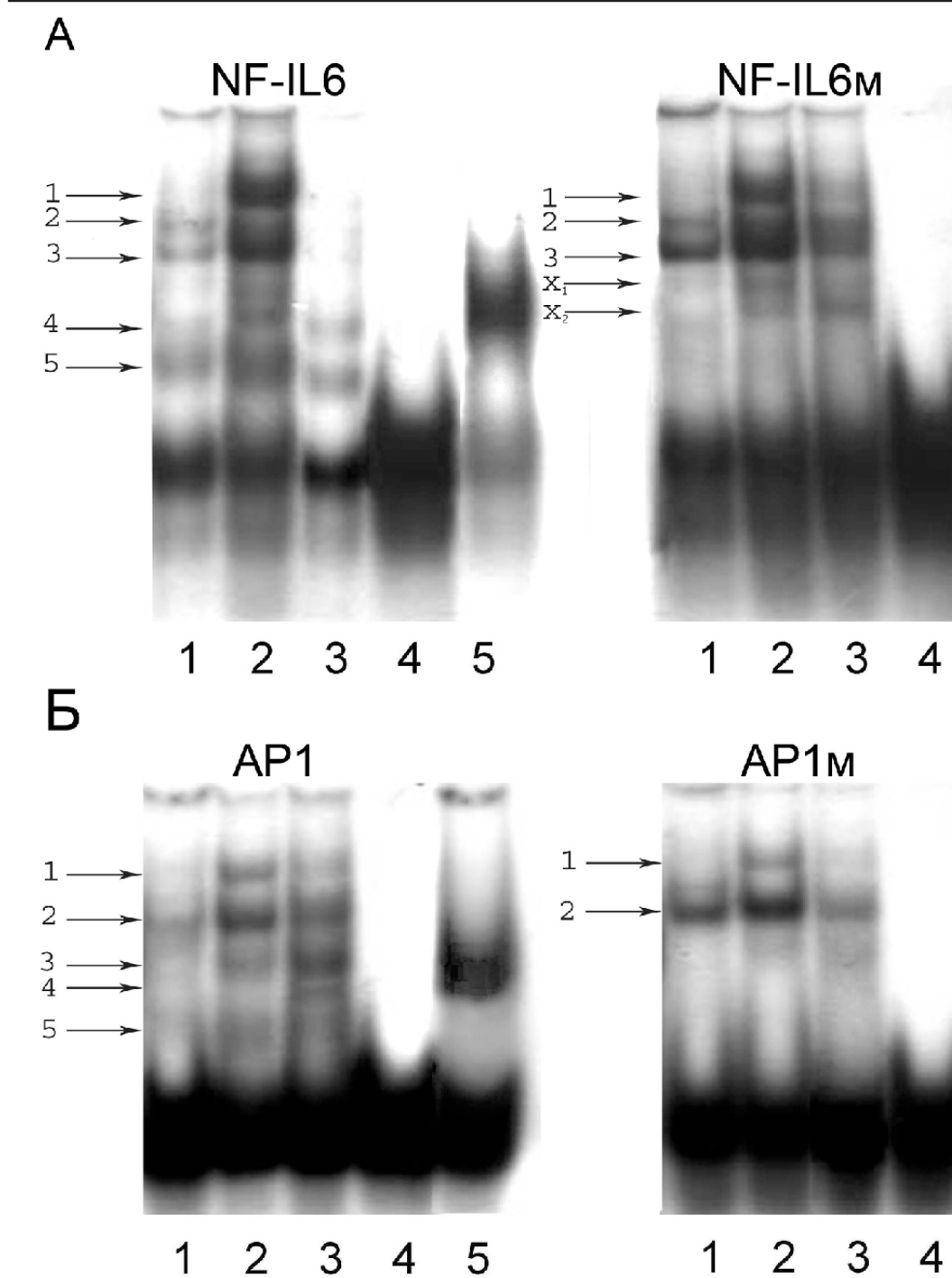


Рисунок 2.

Связывание белков ядерных экстрактов штаммов *P. berghei* с различной чувствительностью к хлорохину с олигонуклеотидами, соответствующими сайтам связывания для NF-IL6, AP1 транскрипционных факторов, и их мутантными аналогами.

А - NF-IL6, NF-IL6m; Б- AP1, AP1m.

1- ядерный экстракт штамма N;

2- ядерный экстракт штамма LNK-65;

3- ядерный экстракт штамма LNK-65 ChlR;

4- подвижность свободного зонда;

5- ядерный экстракт клеток крови мышей;

→ комплекс меченого олигонуклеотида с белком(ами) ядерного экстракта.

x – новые полосы “задержки”, появившиеся с мутантным аналогом зонда.

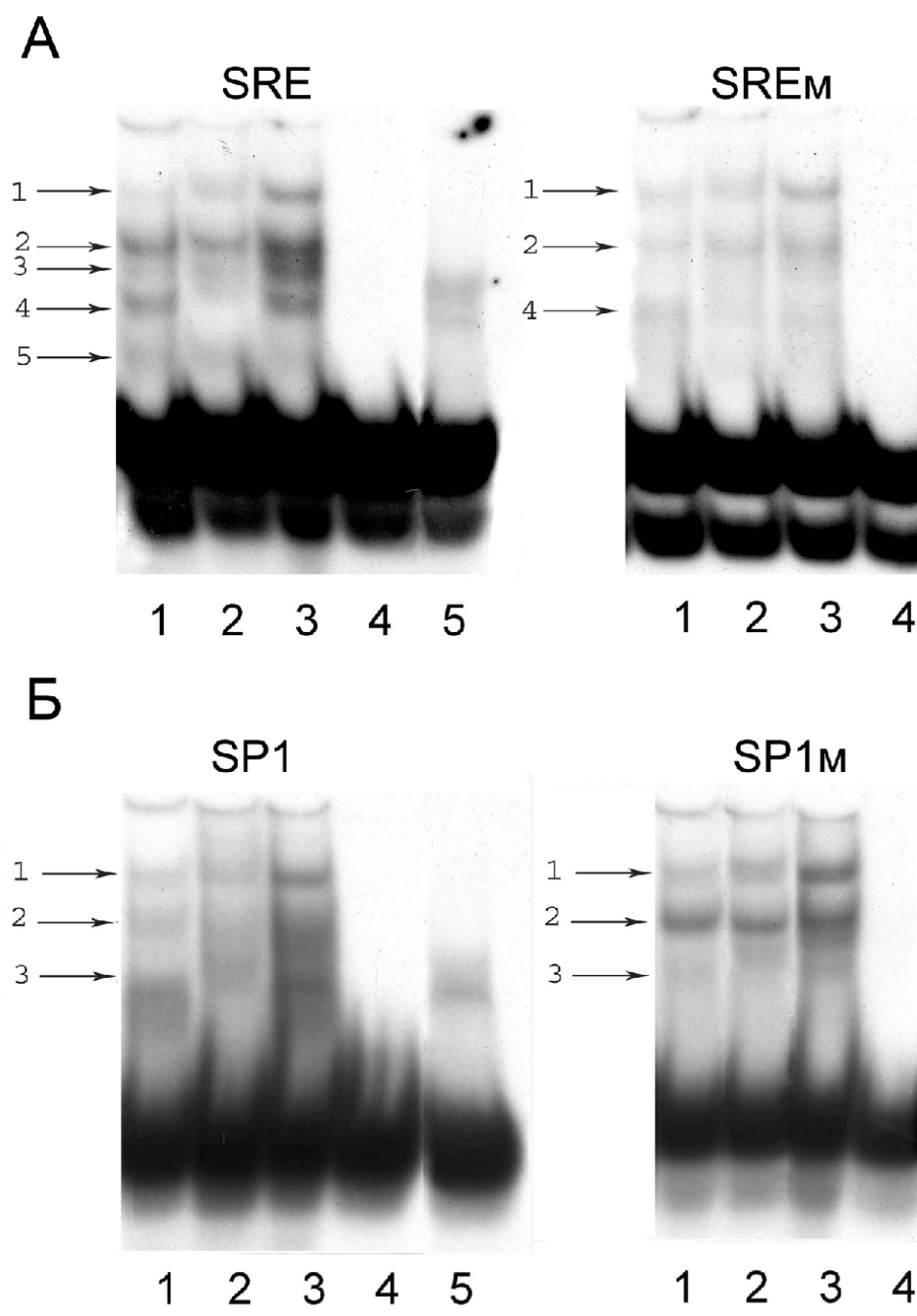


Рисунок 3.

Связывание белков ядерных экстрактов штаммов *P. berghei* с различной чувствительностью к хлорохину с олигонуклеотидами, соответствующими сайтам связывания для SP1 транскрипционного фактора, SRE элемента, и их мутантными аналогами.

А - SRE, SREm; Б - SP1, SP1m.

1- ядерный экстракт штамма N;

2- ядерный экстракт штамма LNK-65;

3- ядерный экстракт штамма LNK-65 ChlR;

4- подвижность свободного зонда;

5- ядерный экстракт клеток крови мышей;

→ - комплекс меченого олигонуклеотида с белком(-ами) ядерного экстракта.

Оба резистентных штамма отличаются от чувствительного к хлорохину штамма N и по набору ядерных белков, взаимодействующих с олигонуклеотидом, воспроизводящим сайт связывания транскрипционных факторов семейства AP1 (рисунок 2Б). Использование AP1 олигонуклеотидного зонда и его мутантного аналога, показывает, что в отличие от чувствительного штамма в ядерных экстрактах хлорохинрезистентных штаммов имеется белок, обладающий сходством с представителями семейства AP-1 (3-я полоса задержки), ДНК-связывающая активность которого усиливается в параллели с возрастанием хлорохиностойчивости, а у высокорезистентной линии LNR-65ChlR есть еще один белок (4-я полоса задержки) сходный с AP1 фактором.

У штаммов плазмодия с различной устойчивостью к хлорохину различалась также активность белка, сходного с SRF. В отличие от чувствительного штамма, у обоих резистентных в картине связывания наблюдалась полоса 3, значительно более выраженная у высокорезистентной линии LNR-65ChlR (рис. 3А). Эта полоса пропадала при использовании мутантного по SRE олигонуклеотида. Определённые различия между штаммами N, LNK-65 и линией LNK-65 ChlR отмечались также при использовании SP1 олигонуклеотидного зонда, хотя в этом случае все белки, образующие комплексы, не имели сходства с SP1 (рис. 3Б).

Полученные данные свидетельствуют о глубоких изменениях, произошедших в регуляторном аппарате плазмодия при селекции на хлорохиноустойчивость, что находит отражение в изменениях спектра ДНК-связывающих белков у изученных нами штаммов *P. berghei*. Такие изменения в наборах активности ДНК-связывающих белков должны оказывать влияние на экспрессию большого числа различных генов. Это хорошо согласуется с данными о мультигенной природе хлорохиноустойчивости [5-9] и о значительных изменениях транскриптома малярийного паразита в связи с развитием резистентности к хлорохину, а также после действия хлорохина на чувствительных паразитов [13, 22].

До последнего времени сообщений о механизмах регуляции генов, связанных с формированием устойчивости малярийного паразита к лекарствам, в частности к хлорохину, в литературе было очень мало. Лишь в 2003 г. Waller и др. получили данные, указывающие на наличие в гене *crt* регуляторной зоны, располагающейся в 3'-нетранслируемой области гена (3'-UTR) и играющей важную роль в механизме хлорохиноустойчивости: *crt* – модифицированные "нокдаун" клоны, полученные при введении укороченного 3'-UTR на место эндогенного 3'-UTR, проявляли по сравнению с исходной хлорохиноустойчивой линией значительное снижение уровня экспрессии CRT белка – транспортера хлорохина, синтеза соответствующей мРНК и устойчивости к хлорохину, определяемой по IC₅₀ [12]. Секвенирование генома *P. falc.*, закончившееся к 2003 г., открыло возможности идентификации регуляторных белков – факторов транскрипции, сходных с подобными белками высших организмов [23]. Так у плазмодия уже обнаружено три белка, высокоомологичных субъединицам транскрипционного фактора CBF/NF-Y (A, B и C), опознающего ССААТ-бокс, а также выявлен белок, сходный с MBF 1, который осуществляет связь между регуляторными факторами и базальной транскрипционной машиной [24, 25].

Полученные нами данные показывают, что у *P. berghei* имеются белки, ДНК-связывающие домены которых имеют сходство с ДНК-связывающими доменами факторов транскрипции NF-IL6, SRF1 и членов семейства AP1 позвоночных животных. При этом белки, сходные с AP1 и SRF1, а также один из белков, близких NF-IL6, проявляют большую ДНК-связывающую активность у резистентных штаммов. Подобный феномен ранее был отмечен для клеток млекопитающих (MCF-7), где наблюдалось повышение AP1 ДНК-связывающей активности при развитии резистентности к лекарствам [14].

В целом наши данные позволяют сделать предположение о том, что в механизм формирования хлорохиноустойчивости вовлечены ДНК-связывающие белки, участвующие в регуляции экспрессии генов, ответственных за транспорт и

метаболизм хлорохина, и говорят о принципиальной возможности использования олигонуклеотидов, соответствующих сайтам связывания факторов транскрипции высших эукариот, для оценки состояния потенциальных регуляторных факторов плазмодия. Дальнейшее изучение механизмов устойчивости к хлорохину на уровне регуляции генов плазмодия, связанных с хлорохинрезистентностью, может показать новые мишени для действия лекарств и, возможно, откроет новые перспективы использования препаратов хинолинового ряда для лечения малярии.

Авторы благодарят Аршинову Т.В., Драчкову И.А., Лысову М.В. за ценные обсуждения и помощь в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wellems T.E.* (2002) *Science*, **298**, 124-126.
2. *Salganik R.I., Pankova T.G., Chekhonadskikh T.V., Igonina T.M.* (1987) *Bull. WHO*, **65**, 381-386.
3. *Ndifor A.M., Howells R.E., Bray P.G., Ngu J.L., Ward S.A.* (1993) *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **37**, 1318-1323.
4. *Панкова Т.Г., Игонина Т.М., Майер Т.В., Салганик Р.И.* (1996) *Молекуляр. биология*, **30**, 43-50.
5. *Padua R.A.* (1981) *Exp. Parasitology*, **52**, 419-426.
6. *Foote S.J., Kyle D.E., Martin R.K., Oduola A.M.J., Kemp D.J., Cowman A.F.* (1990) *Nature*, **345**, 255-258.
7. *Sidhu A.B., Verdier-Pinard D., Fidock D.A.* (2002) *Science*, **298**, 210-213.
8. *Reed M.B., Saliba K.J., Caruana S.R., Kirk K., Cowman A.F.* (2000) *Nature*, **403**, 906-909.
9. *Bray P.G., Martin R.E., Tilley L., Ward S.A., Kirk K., Fidock D.A.* (2005) *Mol. Microbiol.*, **56**(2), 323-333.
10. *Ekong R.M., Robson K.J.H., Baker D.A., Warhurst D.C.* (1992) *Parasitology*, **106**, 107-125.
11. *Myrick A., Munasinghe A., Patankar S., Wirth D.F.* (2003) *Mol. Microbiol.*, **49**, 671-683.
12. *Waller K.L., Muhle R.A., Ursos L.M., Horrocks P., Verdier-Pinard D., Sidhu A.B., Fujioka H., Roepe P.D., Fidock D.A.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 33593-33601.
13. *Gunasekera A.M., Patankar S., Schug J., Eisen G., Wirth D.F.* (2003) *Mol. Microbiol.*, **50**, 1229-1239.
14. *Daschner Ph.J., Ciolino H.P., Plouzek C.A., Yeh G.C.* (1999) *Breast Cancer Res. Treat.*, **53**, 229-240.
15. *Combates N.J., Rzepka R.W., Chen Y-N.P., Cohen D.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 29715-29719.
16. *Cornwell M.M., Smith D.E.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 19505-19511.
17. *Rabinovich S.A., Kulikovskaya I.M., Maksakovskaya E.V., Chekhonadskikh T.V., Pankova T.G., Salganik R.I.* (1987) *Bull. WHO*, **65**, 387-389.
18. *Francois G., Bringmann G., Dochez C., Schneider C., Timperman G., Ake Assi L.* (1995) *J. Ethnopharmacol.*, **46**, 115-120.
19. *Horrocks P., Lanzer M.* (1999) *Mol. Biochem. Parasitol.*, **99**, 77-87.
20. *Васильев Г.В., Меркулов В.М., Кобзев В.Ф., Меркулова Т.И., Пономаренко М.П., Подколотная О.Ф., Пономаренко Ю.В., Колчанов Н.А.* (2000) *Молекуляр. биология*, **34**, 214-222.
21. *Treisman R.* (1992) *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 423-426.
22. *Llinas M., Bozdech Z., Wong E.D., Adai A.T., DeRisi J.L.* (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1166-1173.
23. *Wilson R.J.M.* (2004) *BioEssays*, **26**, 339-342.
24. *Coulson R.M.R., Hall N., Ouzounis C.A.* (2004) *Genome Res.*, **14**, 1548-1554.
25. *Noort V., Huynen M.A.* (2006) *Trends in Genetics*, **22**, 73-78.

Поступила: 02. 03. 2007.

STUDY OF THE BINDING OF NUCLEAR PROTEINS FROM *PLASMODIUM BERGHEI*
STRAINS WITH DIFFERENT CHLOROQUINE SENSITIVITY TO
OLIGONUCLEOTIDES CORRESPONDING TO REGULATORY ELEMENTS OF
MULTIDRUG RESISTANCE (*mdr1*) GENE

T.G. Pankova, T.M. Igonina, V.F. Kobzev, T.I. Merkulova

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Lavrentiev prosp., 10, Novosibirsk, 630090 Russia; tel.: (383)333-39-10; fax : (383)333-12-78;
e-mail: pankt@yandex.ru.

Using electrophoretic mobility shift assay we first revealed in the nuclear extracts of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* (*P. berghei*) proteins, which bind specifically to the double-stranded oligonucleotides reproducing the binding sites of the transcription factors of AP1 family, NF-IL6 and SP1 involved in the up-regulation of human multidrug resistance (*mdr1*) gene and to the oligonucleotide corresponding to the element responsive for the stimulation by serum (SRE). The nuclear proteins isolated from the *P. berghei* strains with various chloroquine sensitivity bound differently to the most of the oligonucleotide probes used. Mutations in the consensus sequences of AP1, NF-IL6 and SRE led to the loss of some DNA-protein complexes, suggesting the existence of malaria parasite nuclear proteins, whose DNA-binding domains are similar to DNA-binding domains of NF-IL6, SRF1, and AP1 family members. These proteins exhibit greater activities in chloroquine resistant strains. The results obtained denote profound alterations in the plasmodium regulatory apparatus occurred as the result of selection on chloroquine resistance.

Key words: *P. berghei*, chloroquine resistance, transcription factors, oligodesoxyribonucleotides, electrophoretic mobility shift assay.