

## К проблеме множественной лекарственной устойчивости: гипермутабельность как механизм защиты метаболических мишеней бактериальной клетки от цитотоксических ксенобиотиков

Е. И. Черепенко, Д. Н. Говорун

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143

E-mail: dhovorun@imbg.org.ua

---

*Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) в настоящее время изучается в основном с позиций функционирования множественных экспортеров и переполнения клетки белками. Однако часто подобным образом проблема не находит своего решения. Здесь мы кратко суммируем последние достижения в изучении МЛУ и приводим наши результаты по обнаружению МЛУ, возникающей за счет мутирования тесно сцепленных генов, составляющих кассеты. Они могут специально располагаться в клетке (энвиронсома) так, что в отличие от других генов (доместосомы) контактируют с внутриклеточным пространством и главным внутриклеточным потоком веществ. Геном содержит ~100 энвиронсом, и фенотип хемотростойкости возникает за счет мутирования хотя бы одной из них. Когда во внутриклеточный поток попадает мутаген, кассета первая становится областью эффективного локального мутагенеза. Если кассета кодирует белки с природной неструктурированностью и мутация может вызвать в них переход по линии беспорядок—порядок, то это приведет к изменению геометрии внутриклеточного пространства так, что доступ лигандов к мишеням станет невозможным, что обусловит множественную лекарственную устойчивость.*

---

Значительное количество выпускаемых фармакологической промышленностью лекарственных препаратов, а также различных пестицидов предназначено для осуществления единственной цели — убить соответствующую клетку. Это необходимо для предотвращения разных вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных инфекций, а также злокачественного роста собственных клеток данного организма. Создание лекарственных препаратов, способных уничтожать биологически опасные клетки, имеет длительную историю, последние главы которой составляют лекарства мишенного типа [1—5] и так называемые макромолекулярные лекарства [6].

Таким образом, современные лекарственные

цитотоксические средства делят на две группы. Одна из них представлена малыми молекулами — химическими соединениями, обладающими свойствами лигандов по отношению к соответствующим макромолекулам клетки (мишеням). Высокоспецифическое связывание лигандов с мишенными макромолекулами инактивирует последние. Это нарушает естественный порядок протекания метаболических реакций клетки и обрекает ее с высокой вероятностью на смерть. Следовательно, упомянутая группа лекарств представлена метаболическими ингибиторами.

Другую группу самых современных цитостатиков составляют молекулы белков и пептидов, обладающих известной функциональной активностью, которую они не утрачивают при проникновении в клетку с помощью эндоцитоза. Более того, оказалось, что молекулы таких цитостатиков обладают

специальными доменами PTD (protein transduction domains), наделяющими их способностью прохождения через клеточную мембрану. Эти молекулы могут быть узнаны в клетке соответствующими цитоскелетными моторами [7], адресно доставляющими их в нативном состоянии в определенные места клетки, то есть к мишеням действия этих медикаментозных средств.

Завершение проекта «Геном человека» [8–10], открывшего широкие возможности в идентификации различных мишеней действия соответствующего лекарства, и развитие так называемых highthroughput технологий (позволяющих изучать одновременно большое количество параметров на большом количестве образцов) [11] послужили толчком к небывалой интенсификации исследований по созданию новых лекарств. В специальной литературе появились данные, оценивающие скорость появления в течение нескольких лет новых лекарств, выражающуюся в таких цифрах, как 10000 [1] и 3000 [12] новых наименований вместо тех 500 лекарств мишенного типа действия, которые циркулируют на фармацевтическом рынке в настоящее время [1]. Однако расшифровку генетического кода организма можно сравнить лишь с открытием континентов, их же освоение и заселение потребует значительно больших времени и усилий [13].

Наряду с необходимостью решения проблем по идентификации мишеней и дизайна соответствующего лиганда к ним нужно выяснить вопросы, связанные с фармакогеномикой, — эффективным действием лекарства независимо от генетического паспорта индивида [1, 5, 84]. Эффективность терапевтического использования разработанного медикамента неразрывно связана с таким общебиологическим явлением, как возникновение цитотоксической устойчивости при действии на клетку факторов внешней среды, а также эндогенных факторов. Поскольку данная работа ограничивается рамками обсуждения клеточного поведения по отношению только к цитотоксическим ксенобиотикам, составляющим класс малых химических молекул, проблема устойчивости к макромолекулярным лекарствам здесь рассматриваться не будет. Укажем лишь, что в настоящее время эта проблема решается на уровнях эффективности прохождения макромолекулы через клеточную мембрану и подавления иммуногенности такой молекулы в организме и в клетке [6].

Каковы же механизмы возникновения хеморезистентности, в частности, такого явления, как множественная лекарственная устойчивость (МЛУ)? Ниже мы кратко проанализируем известные дан-

ные по этому вопросу, раскроем суть развиваемой нами концепции о причастности явления гипермутабильности к возникновению в клетке МЛУ и охарактеризуем основы такой хеморезистентности.

Генетические и биохимические механизмы возникновения хеморезистентности в бактериальной клетке. Эра антибиотиков, начавшаяся с 40-х годов прошлого века, сыграла в биологии двойную роль: открыла принципиально новый класс терапевтически активных соединений и проложила путь для изучения механизмов устойчивости клетки к антибиотикам, а отсюда — и к другим видам цитотоксической устойчивости. Панораму результатов по мере их поступления при изучении проблемы цитотоксической устойчивости отражают написанные с разницей в 12 лет такие обобщающие работы — обзор 1990 г. [14] и монография 2002 г. [15]. Однако проблема МЛУ остается далекой от своего решения. Нужны новые методы в исследовании биологии клетки. Прежде чем характеризовать предлагаемый нами подход к изучению МЛУ, кратко рассмотрим имеющуюся информацию по этой проблеме.

Отметим, что описанные механизмы хеморезистентности являются по своей природе генетическими. Действительно, ранее установлено, что обработка мутагеном клеток является фактором возникновения устойчивости последних к мишенным метаболическим ингибиторам [16]. Однако в последнее время появляются работы, демонстрирующие возможность эпигенетического механизма возникновения МЛУ [17].

Генетические механизмы хемоустойчивости делятся на две группы. К одной из них относят механизмы, связанные с изменениями соответствующих кодирующих и регуляторных последовательностей клеточного генома. В основе этих изменений могут лежать такие генетические события [14, 15]: 1) амплификация или делеция соответствующего гена; 2) точечные мутации того или иного гена; 3) мутации, обуславливающие дисфункцию *цис*- и *транс*-регуляторных областей соответствующего гена.

Другая группа генетических механизмов, обуславливающих хеморезистентность, связана с приобретением клеткой в результате горизонтального переноса с помощью плазмид, транспозонов и интегронов специальных генов, способных, как правило, нейтрализовать цитотоксические ксенобиотики за счет их деградации или химической модификации, делающей ксенобиотики неактивными [18–20].

Описанные возможные генетические изменения лежат, как установлено, в основе изменений

ряда биохимических процессов, приводящих к цитотоксической устойчивости клетки [14]: 1) изменения в участках мишени, делающие невозможным связывание ингибитора с мишенью, а также изменение концентрации в клетке сайта связывания данного ингибитора; 2) изменение в работе транспортных белков, ответственных либо за проведение веществ внутрь клеток, либо за их выброс из клетки наружу; 3) включение обходных путей метаболического блока, в том числе вероятность структурной мимикрии молекул в клетке; 4) возможность секвестраций в клетке ингибитора и мишени. Кратко охарактеризуем результаты изучения этих механизмов.

*О мутировании и амплификации сайта связывания ингибитора с мишенью.* Этот механизм лежит в основе лишь одинарной хеморезистентности, возникающей при мишенном ингибировании, и здесь мы не будем его подробно рассматривать, поскольку акцент в данной работе ставится на МЛУ. Укажем лишь, что нарушающие связывание токсического лиганда с мишенью точечные, делеционные мутации по этому сайту, а также его амплификация обуславливают фенотип устойчивости к данному ингибитору. В подробностях рассмотрению этого механизма посвящены обзоры [21—23]. Важность ссылки на этот механизм в данной работе заключается в том, что мутация, изменяющая сайт связывания токсического лиганда с мишенью, относится к классу редких генетических событий (вероятность такой мутации составляет величину  $10^{-6}$ ), в то время как мутанты, устойчивые к мишенным метаболическим ингибиторам и обусловленные действием мутагена, возникают с высокой вероятностью ( $10^{-4}$ ) [16]. С какими же генами связан наблюдаемый эффект гипермутирования?

*Транспортные белки бактерий и обнаружение кодирующих их генов.* Бактериальным транспортным белкам, которые удивительно похожи на соответствующие переносчики веществ клеток высших организмов, посвящены обзоры [24, 25]. Они делятся на белки, переносящие вещества из внешней среды через клеточную мембрану внутрь клеток, и белки, выбрасывающие соответствующие вещества из клетки наружу.

Характеризуя первую группу белков, укажем, что в связи с микродерматологическими особенностями клеток грамотрицательных бактерий, обладающих тремя барьерами для проницаемости веществ (внешней липополисахаридной мембраной, сетчатом, определяющим остов клетки пептидогликановым слоем, и цитоплазматической мембраной), белки этой группы бывают двух типов: отве-

чающие за транспорт веществ через 1) внешнюю и 2) плазматическую мембраны. Оказалось, что белки первого типа образуют во внешней мембране специальные каналы и составляют три класса: порины, формирующие заполненные водой поры; пориноподобные белки, обладающие, однако, сайтами связывания определенных веществ; мембранно-рецепторные белки, сопряженные с таким якорным белком, как TopB, продлевающим соответствующий транспортный канал непосредственно через плазматическую мембрану [25].

Что касается переносчиков веществ через плазматическую мембрану, то они достаточно многочисленны и делятся на две группы относительно источника энергии, используемой для их работы. Этими источниками являются либо АТФ (первичная система транслокаций), либо мембранный потенциал клетки — pmf (proton motive force) (вторичные переносчики).

Среди плазматических переносчиков выделяют четыре группы белков: 1) составляющие системы облегченной диффузии (uniport); 2) являющиеся вторичными переносчиками, соединяющими транспорт данного растворенного вещества с одновременным транспортом ионов  $H^+$  или  $Na^+$  в одном направлении (symport) или в разных (antiport) (т. е. переносчик активируется лишь при связывании второго лиганда); 3) составляющие системы транслокации групп на примере так называемой системы PTS (phosphotransferase system), использующей фосфоэнолпирувил (PEP) для фосфорилирования переносимых через клеточную мембрану молекул сахаров в результате активации специального комплекса: фермент I—белок Hpr—фермент II; последний за счет различных комбинаций своих субъединиц обуславливает специфичность в узнавании молекул соответствующих сахаров; 4) составляющие систему активного транспорта, зависящего от существования определенного связывающего белка, узнающего субстрат в периплазме и доставляющего его к специальной плазматической транспортной АТФазе (traffic ATPase) [26], которая у бактерий представлена субъединицами, кодируемыми различными генами, а у высших организмов — одной полипептидной цепью (ABC-переносчик).

Многочисленные работы по получению и изучению мутантов, возникших вследствие транспорта различных соединений (системы проведения внутрь клеток гистидина, мальтозы, фосфатов, различных аминокислот — см. обзор [28]) первичными и вторичными переносчиками, показали, что мутации генов, кодирующих транспортные белки, являются достаточно редким событием (его вероятность не превышает  $10^{-6}$ ).

Что касается выброса веществ из клетки, то впервые этот процесс был описан датским биохимиком Дано [29] и десятилетие спустя в мембране МЛЮ раковых клеток был найден белок Pgp 170, названный MDR1, ответственный за процесс выброса различных неродственных соединений из клетки [29]. Такие соединения получили название аллокритов [30]. Новейшие исследования, посвященные этому белку, представлены в обзорах [30, 31]. Отличительной чертой его строения оказалась парность, во-первых, расположенных в цитоплазме нуклеотидсвязывающих доменов. Из-за этого такой тип переносчика веществ получил название ABC-переносчик от ATP-binding cassette [27]. Во-вторых, количество сегментов молекулы, пересекающих мембрану, также парно и выражается формулой  $6 + 6$ . Создается впечатление, что MDR1 — это продукт дубликации определенного предшественника. Обращает на себя внимание тот факт, что MDR1 представлен как бы слитой структурой из тех субъединиц, из которых состоят транспортные АТФазы бактерий [27].

Таким образом, дизайн самых различных транспортных белков, очевидно, связан с эксплуатацией некой общей темы, допускающей, однако, определенные вариации, позволяющие молекулам этого класса функционировать и как импортеры, и как экспортеры веществ. Модель работы экспортера MDR1 представлена в работе [30] (рис. 1) Согласно этой модели, димер трансмембранной части белка (TMD — transmembrane domain) располагается в мембране так, что со стороны поверхностного слоя мембраны образует воронку, заполненную водой. Находящиеся в цитоплазме ABC-домены, имеют L-форму, димеризуясь за счет структуры, отраженной длинной стороной этой буквы. Структура, схематически представленная короткой частью буквы, расположена симметрично линии димеризации ABC-доменов и осуществляет контакт этих доменов с TMD-участком молекулы со стороны цитоплазмы. Гидрофильное вещество может выбрасываться непосредственно в воронку. Гидрофобное же вещество, оказавшееся во внутреннем слое мембраны, подвергается латеральной транслокации на основе TMD и выбрасывается наружу.

Наличие таких молекул-насосов — неотъемлемая черта организации клетки от бактерий до человека [32]. На большую важность существования этого типа молекул указывает то, что у выполняемой ими функции обнаружен значительный запас прочности. Это объясняется присутствием у эукариотов наряду с MDR-насосом второго экспортера белка MRP1 (multidrug resistance protein) [31, 33—36]. Главное отличие MRP насоса от MDR

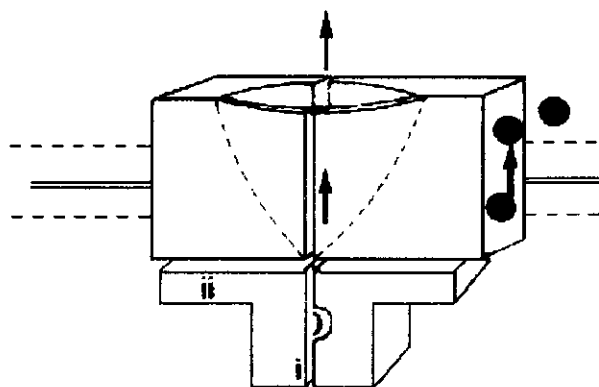


Рис. 1. Схематическое изображение устройства ABC-переносчика [30] (объяснение схемы представлено в тексте)

закключается в том, что первый экспортирует аллокриты в виде конъюгатов с глутатионом.

У бактерий открыты работающие за счет мембранного потенциала многочисленные экспортеры, многие из которых множественные [37, 38]. Установлено, что по своему строению они составляют три семейства белков: 1) MFS (major facilitator superfamily), TMD которых пересекает мембрану 12—14 раз; 2) Smr (small multidrug resistance), TMD которых пересекает мембрану 4 раза; 3) RND (resistance/nodulation/division), TMD которых пересекает мембрану 12 раз, но имеются еще две большие экстраплазматические петли.

Еще одной характеристикой этих белков является то, как они работают, — сами по себе или нуждаются в дополнительных белках — таких, которые осуществляют физический контакт между плазматической мембраной и периплазмой (MFP — membrane fusion proteins), а также с внешней мембраной (OMF — outer membrane factor). Схема известных экспортеров представлена на рис. 2 [39]. Показаны два типа насосов: LmgA — АТФазы, остальные используют энергию pmf. Насосы NorA и QacA — представлены только MFS белками и не требуют для своей функции дополнительных белков. Насос EmrB — это также MFS белок, но ему необходимы белки типа MFP (контакт между мембранами) и типа OMF (контакт с окружающей средой). Эти функции выполняют соответственно белки EmrA и TolC (рис. 2). Экспортер из семейства RND требует для своей работы также сопряжения с белками типа MFP и OMF, функцию которых выполняют соответственно белки AcrA и TolC. В нижней части рисунка приведены названия субстратов, являющихся аллокритами установленных экспортеров.

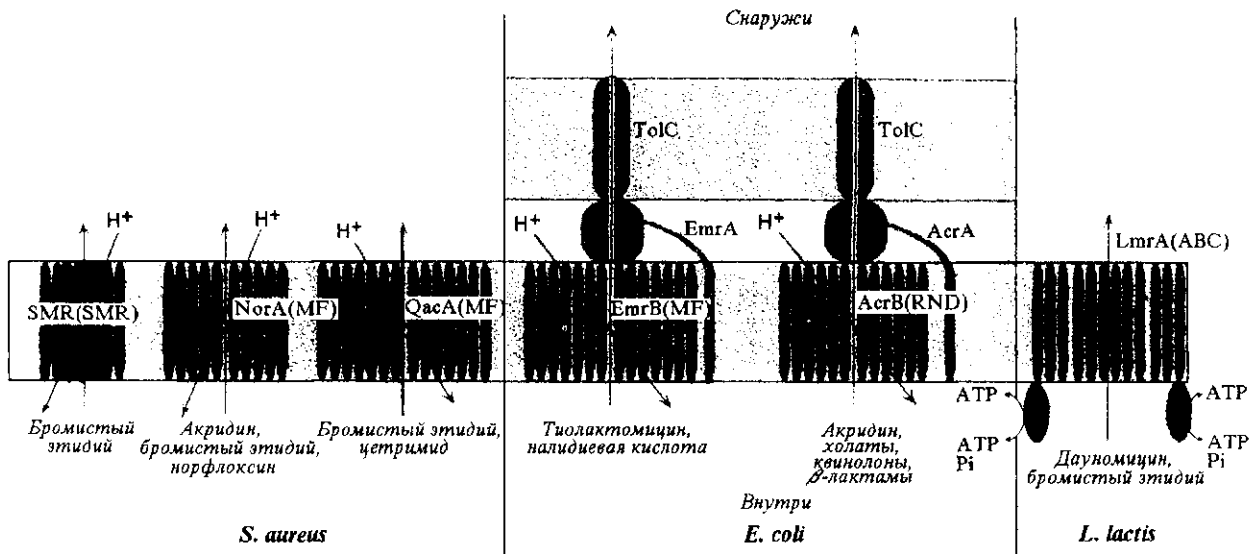


Рис. 2. Бактериальные насосы, перекачивающие множественные субстраты [39] (объяснения см. в тексте)

Клонирование в составе мультикопийных плазмид фрагментов геномной ДНК, содержащей гены, кодирующие известные экспортеры, позволяет увидеть по передаче признака от устойчивой клетки к чувствительной функцию этих насосов и изучить особенности последних. Однако часты случаи выявления цитотоксической устойчивости, не связанные с какими-либо изменениями в работе транспортных белков.

Так, при обработке клеток *Escherichia coli* мутагеном возможно образование с высокой частотой ( $10^{-4}$ ) [16] мутантов *glf*, устойчивых к метаболитическому ингибитору глифосату, инактивирующему единственную мишень клетки — 5-энолпирувил-3-фосфатшикимат синтазу (EPSPS) — шестой фермент шикиматного пути синтеза [40]. (Сразу же отметим, что данные клетки *a priori* не обладают активностью, разрушающей неприродную C-P связь, присущую глифосату [41].) Однако клонирование фрагментов геномной ДНК пяти мутантов *glf* не дало положительных результатов [42], что можно было бы ожидать в случае активации экспортера с помощью мутации, которая должна быть доминантной. Одна из изучаемых мутаций оказалась рецессивной и при этом не нарушала процесса поступления глифосата в клетку [43]. Может ли мутаген индуцировать с высокой вероятностью обходные пути функции мишени, блокированной метаболитическим ингибитором?

Об обходных путях метаболитических блоков в клетке. Этот вопрос рассматривался в обзорах [14, 21]. Соответствующей теории еще не существует

(появляются лишь первые попытки [44]) и это — область примеров. Мы задались целью, используя конкретный пример, получить ответ на вопрос — может ли мутаген и если да, то с какой эффективностью, стимулировать обходные пути возникшего в клетке метаболитического блока?

В качестве такого примера нами выбран клеточный синтез GMP.

Пути синтеза пуринов досконально изучены: это путь *de novo*, дополнительный путь (*salvage pathway*) и шунт, соединяющий эти два пути [45—47]. Если каждый путь и шунт выключить с помощью мутации (для этого удалось сконструировать специальный штамм SØ 609 [46]) и, используя библиотеку генов, клонировать фрагменты, комплементирующие такие мутации, то должны быть лишь три типа таких фрагментов. Однако клонирование выявило их семь [48]. Ясно, что четыре «лишних» типа отражают возможности клетки обходить блок. Укажем здесь, что подтверждением того, что изучение «артефактов» клонирования может быть, как указано в [48], методом изучения обходных путей, служит работа [49]. В этом исследовании дефектные по системам репарации одностранных разрывов клетки, чрезвычайно чувствительные к УФ облучению, трансформировали банком генов в мультикопийных плазидах и отбирали клоны, устойчивые к УФ свету. Анализ таких клонов показал, что данный дефект исправлялся с помощью неожиданной активности РНКазы Т, необходимой для процессинга тРНК и 5S РНК. Это может быть только в том случае, если РНКазы

Таблица 1

Сравнение величин реверсии под действием мутагена нитрозонитрогуанадина фенотипа  $Gua^+$  клеток SØ609 с фенотипом ауксотрофии  $Pro^- \rightarrow Pro^+$  и  $Arg^- \rightarrow Arg^+$  штаммов AB1157 и B3898

Штамм	Фенотип					
	$Gua^- \rightarrow Gua^+$		$Pro^- \rightarrow Pro^+$		$Arg^- \rightarrow Arg^+$	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
SØ609	$2 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-8}$	—	—	—	—
AB1157	—	—	$5 \cdot 10^{-8}$	$5 \cdot 10^{-8}$	—	—
B3898	—	—	—	—	$3 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-8}$

T наряду с РНКазной обладает и ДНКазной активностью 3'-5' полярности.

Обнаружение большого количества фрагментов геномной ДНК, комплементирующей  $Gua^-$  фенотип, позволило сравнить величины реверсии под действием мутагена этого фенотипа с величиной реверсий по другим ауксотрофным маркерам. Результаты этого сравнения показаны в табл. 1. Из приведенных данных следует, что индукции обходных путей метаболического блока под действием мутагена с высокой вероятностью не происходит.

Мы также установили, что если обходной путь может быть связан с явлением структурной мимикрии среди молекул клетки, то мутаген не повышает вероятности этого процесса в случае даже очень похожих молекул. Подобие в структуре молекул, выполняющих, однако, различные функции, могло бы указывать на особую генетическую пластичность соответствующего генетического материала.

Таковыми являются молекулы тРНК<sup>Phe</sup> и РНК I, участвующая в репликации ДНК плазмид *ColE1* ряда [50]. Молекулы сложены в виде клеверного листа и имеются участки консенсусных последовательностей, хотя РНК I аминокотилирующей способностью не обладает. Увеличение концентрации тРНК<sup>Phe</sup> в клетке защищает дефектную термолabileную фенилаланил-тРНК синтетазу при непрямой температуре. Оказалось, что подобным свойством обладает и РНК I [51]. Если структурная мимикрия — это результат какой-то особой генетической пластичности, присущей такой структуре, как у этой молекулы, и мутаген способен изменять ее с высокой вероятностью, то свойство РНК I защищать дефектную АРСазу от температуры после обработки клеток мутагеном должно очень часто утрачиваться. Однако этого не происходило, как выявлено в результате изучения 37 колоний трансформантов клеток NP37 с термолabileной фенилаланил-тРНК синтетазой, содержа-

щих либо плазмиду *pBluescript*, либо *pBR322*, реплицирующихся на основе *ori ColE1* (табл. 2).

Приведенные данные показывают, что в клетке, лишенной ферментативной активности, способной разрушить неприродную цитотоксическую фосфоную С-Р-связь глифосата, возникновение устойчивых мутантов с необыкновенно высокой частотой происходит за счет мутаций не в тех генах, которые отвечают за транспорт ингибитора [43] и обходные пути функции мишени, инактивированной упомянутым ингибитором. Обуславливают ли эти мутации процесс секвестрации?

О секвестрации ингибитора в клетке, предотвращающей его взаимодействие с мишенью. Секвестрация — это такая ситуация в клетке, когда доступ ингибитора к мишени по физическим причинам становится невозможным. Изучение этого явления также основано на примерах. Одним из них является предотвращение отравления ферментов солями тяжелых металлов, что происходит при сверхэкспрессии специального белка, предназначенного для связывания этих вредных агентов клетки (см. обзор [14]).

Известно, что у эукариотов секвестрация может быть связана с изменениями параметров эндоцитозного процесса. Для прокариотов существуют такие варианты: 1) возможности возникновения случайного родства к токсическому лиганду у молекулы, отличной от мишени, а также концентрационных эффектов сайта связывания лиганда; 2) вероятность изменения конфигурации внутриклеточного пространства и условий циркуляции веществ в нем.

Многочисленные генетические исследования, выполненные на бактериях, показывают, что секвестрация за счет первого варианта не может осуществляться с высокой частотой. Что касается второго, то исследования только начинаются [52, 53]. Наше внимание привлекла возможность объяс-

Таблица 2

Анализ сохранения свойства защиты термолабильной фенилаланил-тРНК синтетазы от непермиссивной температуры с помощью плазмид у трансформантов клеток штамма NP37 после их обработки мутагеном нитрозонитрогуанидином

Количество трансформантов	Плазида <i>pBluescript</i>	Плазида <i>pBR322</i>	Возможность роста при температуре 42 °С
27	+	-	27
10	-	+	10

нения наблюдаемой с высокой вероятностью секвестрации ингибитора и мишени в результате перекрытия внутриклеточного свободного потока веществ за счет изменений в геометрии цитоплазмы. Такие изменения могут быть при переполнении клетки функциональными белками или в результате обусловленного мутацией перехода от неупорядоченности к упорядоченности (*disorder/order*), характерной для белков с природной неструктурированностью (*natively unfolded proteins* [73]).

О хемотрезистентности и стрессовом ответе клетки, связанном с индукцией синтеза 30—40 дополнительных белков. Эта проблема рассмотрена в обзорах [14, 54]. Здесь кратко укажем, что в настоящее время у бактерий известны следующие системы стрессовой защиты: 1) SOS ответ, контролирующий интактность молекул ДНК; 2) адаптивный ответ на действие алкилирующих агентов на клетку; 3) *oxyR* система, отвечающая на окислительный стресс; 4) *hsp* система защиты от термального воздействия — белки теплового шока [14]; 5) *tag* система защиты клетки от различных ксенобиотиков [54].

Оказалось, что клетки с индуцированными регулонами стрессового ответа проявляют устойчивость к вредным агентам, одновременно к нескольким и разной природы. Авторы [14] отмечают, что: «There appears to be a fundamental association between adaptation to physiological stress and resistance to drugs. The basis of it is not known». («Похоже, что имеется основополагающая связь между адаптацией к физиологическому стрессу и лекарственной устойчивостью. Основа этой связи неизвестна».) Спустя 12 лет авторы [54] также указывают, что «less is known about the ability of bacteria to alter their susceptibility to noxious agents by modulating their own intrinsic physiological systems to affect resistance». («Менее известно о способности бактерий к изменению их чувствительности к ядам за счет изменений собственных присутствующих им физиологических систем, отражающихся на устойчивости».)

Приведенные данные показывают, что появление в клетке большого количества новых белков является фактором возникновения хемотрезистентности. Более того, оказалось, что частота спонтанных мутаций, обуславливающих цитотоксическую устойчивость, в случае обычных клеток и этих же клеток с сверхэкспрессией какого-то белка различается на порядок, увеличиваясь в последнем случае [14]. Как же изменяется геометрия цитоплазмы в таких клетках и как она обуславливает наблюдаемые эффекты? С позиций концентрационных эффектов белков в клетке находит объяснение и описанный эпигенетический механизм МЛУ.

Об эпигенетическом механизме возникновения МЛУ. Такой механизм установлен в работе [17]. Обратив внимание на то, что метастазы в 20 раз устойчивее к определенному ингибитору (и ингибиторам) по сравнению с первичной опухолью и дело не в транспорте веществ, а в разном окружении этих клеток, авторы предположили наличие внеклеточных факторов, ответственных за МЛУ. В поисках этих факторов они стали изучать корреляции между хемоточувствительностью изучаемого материала и белковым составом сред инкубирования гистокультур и монослойных клеток опухолей. Было показано, что хемоточувствительность связана с присутствием в среде инкубирования двух белков. Ими оказались соответственно кислый и основной факторы роста фибробластов *aFGF* и *bFGF*. Сам по себе первый не важен, но действие второго он значительно усиливает. Ингибиторы и антитела к этим факторам восстанавливали чувствительность клеток к ингибиторам.

Для мышей удалось показать выраженный лечебный эффект в случае метастаз легких, используя обычную химиотерапию в сочетании с ингибиторами FGF. Каким будет результат для человека и каков механизм действия FGF, повышение содержания в злокачественных клетках которого вызывает фенотип МЛУ этих клеток? Это еще предстоит установить.

Об эффектах внутриклеточ-

ных молекулярных «столпотворений», геометрии цитоплазмы, молекулярных транслокаций и природной неструктурированности белков. Свойства большинства белков изучены в условиях разбавленных растворов (0,1 %). В клетке же их концентрация составляет от 20 до 35 % [53, 55]. Автор обзора по этой теме подчеркивает: «The persistent neglect of this property by biochemists should be remedied» [56]. («Необходимо положить конец постоянному игнорированию этого свойства биохимиками.») В работах [57—63] предложен термин «crowding» (и overcrowding). Математический расчет показал, что при скупченности количество степеней свободы молекул сокращается и влияние одних молекул на активность других становится значимым. Уже в 10 %-х белковых растворах уровни компактизации молекул резко повышаются так же, как и реакции само- и гетероассоциаций. Константы молекулярных ассоциаций в плотных растворах на два—три порядка выше таковых для разбавленных растворов и в таких условиях возрастает роль шаперонной и шаперониновой активностей белков [64—68]. (Действительно, из «забитой» белками раковой клетки оказалось возможным выделить шаперон Hsp70, удерживающий обрабатываемый им пептид, являющийся раковым антигеном конкретного больного, и с помощью этого пептида удалось эффективно активировать Т-лимфоциты, убивающие раковые клетки [69].)

Одной из возможностей экспериментального изучения внутриклеточного пространства являются исследования так называемой Min системы бактериальной клетки, создающей ориентиры плоскости деления клетки [52]. При делении этой клетки специальный белок FtsZ охватывает клетку посередине кольцом (Z ring), которое удерживает все, что нужно для образования в правильном месте перегородки между дочерними клетками. За правильную посадку белка FtsZ в нужном месте клетки и отвечают три белка min оперона, состоящего соответственно из трех генов *minC*, *minD* и *minE*. Если MinC и MinD не допускают произвольной локализации Z кольца, то MinE, осциллируя вдоль длинной оси клетки (что позволяет измерять расстояние между локализацией нуклеоида и серединой клетки), определяет закладку перегородки деления клетки точно посередине клетки. Можно получить мутант (*rodA*), обращающий палочку в шар так, что для внутриклеточного пространства понятие «длинная ось» теряет смысл. Как MinE будет себя вести в таком пространстве? Оказалось, что и в этом случае белок движется в клетке на расстоя-

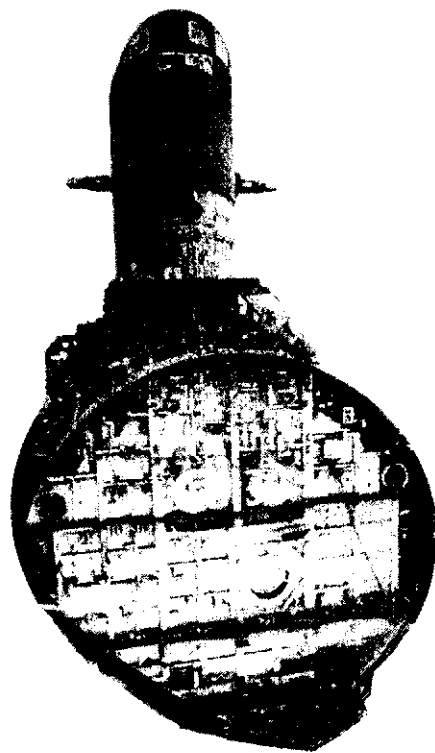


Рис. 3. Монтаж аппаратуры атомарины как модели внутреннего содержания клетки [85]

ние, самое отдаленное от места своего синтеза [52]. Таким образом, исследование свойств белков min оперона открывает возможности изучения внутриклеточного пространства и роли его геометрии для функционирования клетки.

Как движутся молекулы внутри клетки? Для изучения этого вопроса в настоящее время используется в основном метод FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Его суть состоит в измерении скорости восстановления в небольшом участке клетки (< 1 % поверхности фибробласта), заполненном флуоресцентным красителем, флуоресценции после ее тушения с помощью специальной лазерной аппаратуры.

Три фактора определяют подвижность молекул в клетке: 1) вязкость жидкой фазы; 2) химическое связывание с макромолекулами; 3) эффект столкновений малых молекул с макромолекулами (рис. 3). Малые молекулы движутся в клетке в четыре раза медленнее, чем в воде, и чем больше объем клетки, тем больше расстояния, на которые они перемещаются, и наоборот [70]. Более того, во внутриклеточном пространстве движутся и молекулы белков.



Используя природную флуоресценцию белка GFP, удалось показать, что сам по себе белок двигался внутри клетки *E. coli* так, что восстановление флуоресценции на обесцвеченной лазерным лучом поверхности происходило со «скоростью»  $7,7 \pm 2,5$  мкм<sup>2</sup>/с. При слиянии GFP с белком MBP (связывающим мальтозу) эта скорость снижалась до  $2,5 \pm 0,6$  мкм<sup>2</sup>/с. Примечательно, что упомянутая скорость также снижалась в два раза в условиях сверхэкспрессии GFP в клетке. Это указывает на зависимость подвижности молекул от конфигурации внутриклеточного пространства. Оказалось, однако, что прибавление шести His остатков к молекуле GFP резко замедляло и подвижность молекулы, модифицированной подобным образом. Следовательно, не только вязкость и геометрия цитоплазмы, но и различные факторы, определяющие возможность химических взаимодействий, отражаются на внутриклеточном потоке веществ [55].

В связи с выявлением роли конфигурации внутриклеточного пространства в определении возможности свободного потока веществ наше внимание привлек феномен природно неструктурированных белков (natively unfolded proteins). Начало их изучения положено в работах [71, 72] (см. обзор [73]).

Анализ первичных последовательностей множества белков показал, что очень часто обнаруживаются последовательности длиной 40—50 аминокислотных остатков, не подчиняющиеся законам глобулярной упаковки молекулы белка. Как эти участки организованы, в настоящее время остается неизвестным, и такие белки называют «intrinsically destructured proteins». В клетках эукариотов их доля варьирует в пределах 30 % и обнаруживаются они также в клетках эу- и архебактерий. Даже высказывается предположение о том, что в физиологических условиях наличие таких белков является скорее правилом, чем исключением [73]. Изучению биологического значения упомянутых белков уделяется большое внимание [74, 75]. Считается, что по сравнению с жесткой 3-D структурой они обладают большей гибкостью, что особенно важно для эффективного протекания процессов молекулярных узнаваний и ассоциаций.

Огромную биологическую роль играет способность этих белков к переходам от неупорядоченности к упорядоченности (disorder/order), от гибкой структуры к жесткой. Какие преимущества это свойство дает клеткам для функционирования, перечислено в [73] (возможность обеспечения высокой специфичности взаимодействий при низком сродстве взаимодействующих компонентов; воз-

можность взаимодействия с несколькими различными мишенями; расширение поверхности взаимодействий; упрощение регуляции молекулярных связей; возможность снижения времени жизни белковой молекулы, что особенно важно для молекул регуляторных белков). Установлены факторы, обуславливающие переходы от гибкой к жесткой структуре белка. Это — ди- и тривалентные ионы металлов, повышение концентрации белка в растворе, димеризация молекул белков, возможность взаимодействий доменов одних белков с доменами других, а в случае рибосомных белков — это переход рибосом из нефункционального в функциональное состояние. Возникает вопрос о возможности индукции в генах, кодирующих такие белки, мутаций, способных обусловить переход от гибкой к жесткой структуре белка и таким образом изменить конфигурацию внутриклеточного пространства клетки.

Не открывается ли возможность исследования этого вопроса при изучении основ гипермутабильности по признаку возникновения устойчивости клетки к мишенному ингибитору, а также основ возникновения с высокой вероятностью множественной устойчивости?

Почему мутации, сообщающие за счет секвестрации устойчивость клетки к мишенным ингибиторам, возникают на два порядка чаще мутирования самих мишеней и почему клетки с такими мутациями становятся, как правило, множественно устойчивыми? Итак, изучение одного из полученных в опыте по мутагенезу глифосатустойчивого мутанта клеток *E. coli*, неспособных гидролизовать токсическую С-Р связь в молекуле этого ингибитора, показало, что глифосат не является для указанных клеток аллокритом и процесс его поступления в клетки названного мутанта не нарушен. Такие же свойства проявили еще 12 изученных мутантов из этого же опыта по мутагенезу [42, 43]. (Эти мутанты возникают на два порядка чаще, чем мутанты, несущие мутации по мишени, делающей ее нечувствительной к действию ингибитора, —  $10^{-4}$  и  $10^{-6}$  соответственно.) Полученные данные указывают на то, что самым высоковероятным механизмом возникновения устойчивости данных клеток к мишенным ингибиторам может быть процесс секвестрации в клетке лиганда и мишени. Как может осуществляться этот процесс?

Мы показали, что высокая вероятность возникновения глифосатустойчивости или гипермутабильности признака перехода клетки от ингибиторочувствительности к ингибиторостойчивости связана с наличием в геноме большого числа генов и мутирование хотя бы одного из них приводит к фенотипу

устойчивости. Крупномасштабное картирование 21 *gly*<sup>r</sup> мутации выявило их разбросанность по всему геному [76]. Исходя из частоты возникновения таких мутаций ясно, что в данном геноме должно быть около 100 локусов, ответственных за возникновение хеморезистентности. Могут ли они содержать какие-то специальные гены хеморезистентности или гены, определяющие самые разные функции, и отвечать при этом за фенотип устойчивости? То, что последнее верно, подтверждает изучение множественной устойчивости у мутантов, отобранных по устойчивости только к одному, мишенному ингибитору. При тестировании на основе всего лишь трех различных ингибиторов (глифосата — *gly*, 6-азаурацила — *bau* и S-2-амино-L-цистеина — *aec*) мутантов, отобранных по устойчивости к глифосату, до 80 % из них оказались множественно устойчивыми [77]. (Ясно, что при увеличении ассортимента используемых ингибиторов эта цифра может возрасти вплоть до 100 %.) Удивительным оказалось то, что если выход двойных, тройных и т. д. мутантов зависит от концентрации мутагена, то величина МЛУ изучаемых мутантов от нее не зависела при варьировании этой концентрации в пределах двух порядков [77]. При измерении вероятности возникновения устойчивых к различным ингибиторам мутантов в одной и той же популяции клеток эта величина оказалась одинаково высокой ( $10^{-4}$ ) для всех случаев. Следовательно, специальных генов хеморезистентности быть не может (емкости генома просто не хватило бы) и гены, выполняющие различные функции, причастны к явлению хеморезистентности.

Мутации в каком гене могут приводить к секвестрации лиганда и мишени? Для изучения одного примера из 100 возможных мы выбрали множественно устойчивый рецессивный мутант *gly*<sup>r</sup> *6-aur*<sup>r</sup> *aec*<sup>r</sup>. Поскольку доминантным является дикий аллель искомого гена, мутации в котором обуславливают фенотип устойчивости к глифосату, то привнесение в клетки устойчивого мутанта нуклеотидной последовательности, содержащей такой аллель, не позволит клеткам мутанта расти на ингибиторе и искомым ген таким образом может быть найден. Нуклеотидные последовательности всего генома клетки *E. coli* в виде фрагментов, упорядоченных согласно генетической карте, представлены в библиотеке генов, созданной на основе векторного фага лямбда EMBL3 [78]. Определив методами генетического сцепления, в каком месте генома находится изучаемая мутация, стало ясно, в каком фаговом клоне библиотеки хромосомных генов находится искомая нуклеотидная последовательность. Субклонирование ее различных участков, а также

трансформация клеток изучаемого мутанта и позволяют установить «кто есть кто». Прделав такую работу [77], мы выяснили, что мутация, сообщающая устойчивость к глифосату, содержится в нуклеотидной последовательности, кодирующей ген *fis*. С ней на 85 % сцеплена мутация, сообщающая устойчивость ко второму ингибитору — *aec* и находящаяся на участке последовательности, кодирующей ген *acrEF*, отстоящий от гена *fis* на расстоянии 4 тыс. п. н. (Для краткости опустим здесь описание функций этих генов.) Мутация, определяющая устойчивость к третьему ингибитору, расположена также недалеко и сцеплена с мутацией гена *fis* на 52 %. Таким образом, возникновение фенотипа МЛУ связано с одновременным мутированием даже при низких концентрациях мутагена трех различных тесносцепленных генов, отвечающих за фенотип хеморезистентности и попадающих под определение кассеты генов.

В результате установления этого факта возникли два вопроса: 1) как достигается первоочередность мутирования генов в кассетах хеморезистентности и 2) как может происходить секвестрация лиганда и мишени в клетке вследствие мутирования генов в кассетах хеморезистентности? На оба этих вопроса можно найти ответы в рамках развиваемых нами следующих представлений.

Все гены генома делятся на две группы. Одну из них составляют гены, не реагирующие непосредственно на условия функционирования клетки и отвечающие только на внутренние сигналы. Возможно, они специально локализованы во внутренних структурах клетки и организованы так, что их можно было бы обозначить термином «доместосома» (*domestic* — для внутреннего пользования). Другая группа включает гены, предназначенные для узнавания окружающей среды и их можно было бы обозначить термином энвиронсома (от *environment* — окружение). (О возможности существования в клетке машинерии, чувствующей окружение клетки, отмечается в [79].) Отличительной чертой организации этих генов может быть их обязательное экспонирование во внутриклеточное пространство и возможность непосредственного контакта со свободным потоком веществ внутри клетки. Таким образом, эти гены реагируют на появление в клетке мутагена первыми. Кассетная организация генов хеморезистентности, обуславливающая, возможно, какое-то структурное единообразие, обеспечивает высокую локальную эффективность мутационного процесса и высокую вероятность его одновременного протекания на протяжении всей кассеты.

Как мутирование генов в энвиронсомных кас-

сетях может обусловить МЛУ фенотип клетки за счет секвестраций лигандов и мишеней? Это возможно в том случае, если продукты мутантных генов способны изменить конфигурацию внутриклеточного пространства клетки и тем самым перекрыть свободный поток в клетке или молекулярную транслокацию (по терминологии [70]) для того или иного вещества (в качестве модели клетки см. рис 3, демонстрирующий способ монтажа аппаратуры в атомарине, при нарушении которого необходимые просветы в монтировке не образуются).

Каковы факторы изменения конфигурации внутриклеточного пространства? С большой вероятностью на эту роль претендовать природно неструктурированные белки (natively unfolded proteins) с их возможностью перехода от гибкой к жесткой структуре. Если дикий аллель соответствующего гена детерминирует гибкую структуру, обладающую большей плотностью упаковки и большей эффективностью молекулярных ассоциаций по сравнению с жесткой структурой, то он должен быть доминантным, что и наблюдается в опыте [43]. Экспериментально еще предстоит доказать, кодируют ли энвиронсомные гены белки этого класса и возможен ли переход в их молекулах от гибкости к жесткости в результате мутации. Если ~30 % белков клетки могут принадлежать к молекулам этого типа [73], то примерно одна треть генов бактериальной клетки должна быть вовлечена в процессы сканирования химического окружения клетки. Поскольку новые данные генетического картирования позволили связать возникновение с вероятностью  $10^{-4}$  мутантов, устойчивых к мишенному ингибитору, с возможностью индукции мутаций в одном из 100 различных локусов генома и, таким образом, с наличием 100 энвиронсом на клетку, то энвиронсома может содержать кассету из ~10 генов (в то время как доместосома — примерно в три раза больше). Если доместосомы и энвиронсомы структурируются в клетке регулярно, то внутренность клетки может напоминать отсеки субмарины, которые, однако, закрываются подобно жалюзи все сразу от сигнала, исходящего с любой энвиронсомы.

Клетка переходит в режим строго контролируемой, адресной канальной передачи субстратов, доступ ксенобиотиков к мишеням невозможен и клетка становится хемотройстойчивой.

Если энвиронсомы существуют и их интактность — это свидетельство благополучия клетки в борьбе за выживание, то как влияют на возникновение хемотройстойчивости клетки такие факторы перестроек молекул ДНК, как процессы генетической рекомбинации и интеграция в геном клетки

вирусных ДНК? На примере одного из штаммов *E. coli* показано, что дочерние продукты рекомбинации геномов генетического донора и реципиента устойчивы к шестикратным количествам ингибитора по сравнению с родительскими клетками [80]. В случае же клеток, в геном которых встроена вирусная ДНК, вероятность возникновения устойчивых к мишенному ингибитору мутантов повышается в 2—3 раза [42]. Еще предстоит определить вклад каждого возможного фактора, определяющего эти результаты (включая возможность переполнения клетки белками). Также представляло интерес изучить поведение энвиронсом по отношению к физическим факторам внешней среды. Воздействие в течение 7 мин на растущие клетки электромагнитного излучения в диапазоне частот 54—76 ГГц не изменило характера устойчивости клеток к глифосату (Н. Теплюк, Е. Черепенко — неопубликованные данные).

Итак, на пути решения обезоруживающей современной фармакологии проблемы МЛУ, изучение которой в настоящее время связано в основном с исследованиями МЛУ экспортеров и констатации роли в феномене хемотройстойчивости факта переполнения клетки белками, сформулировано новое представление. Оно связано с возможностью существования генов, не «спрятанных» в толще клеточных структур, а выходящих во внутриклеточное пространство (энвиронсом) и контактирующих непосредственно со свободным внутриклеточным потоком веществ.

При попадании в клетку мутагена мутационный процесс протекает с высокой локальной эффективностью на основе именно этих генов, измененные продукты которых за счет возможных переходов от гибкой к жесткой структуре (не влияя на каталитическую функцию белка) изменяют конфигурацию внутриклеточного пространства, предотвращая доступ лиганда к мишени в клетке. Вероятность такой гипермутабильности клетка может использовать как механизм метаболической защиты при функционировании в неблагоприятных условиях. Возможно, такая ситуация сложилась в области мировой проблемы борьбы с туберкулезом. Для преодоления МЛУ в рамках развиваемых представлений возникают два вопроса — существуют ли факторы, обращающие продукты генов энвиронсом от жесткой структуры к гибкой, и возможна ли регуляция геометрии внутриклеточного пространства с помощью полимерной терапии и нанотехнологий [81—84]? Изучение механизмов МЛУ открывает перспективы исследования принципов устройства клетки и особенно монтажа клеточных структур.

Таким образом, в изучении проблемы МЛЮ, базирующемся в настоящее время на исследованиях МЛЮ экспортеров, предлагается новый подход, основанный на изучении возможностей регуляции геометрии внутриклеточного пространства, определяющей условия свободного потока веществ в клетке и доступ лиганда к метаболической мишени.

*E. I. Cherepenko, D. M. Hovorun*

On the problem of multidrug resistance: hypermutability as a mechanism to defense metabolic targets from toxic xenobiotics

Summary

*Multidrug resistance (mdr), a scourge of modern pharmacology, is studied mainly as related to the function of multidrug exporters and cell overcrowding with proteins. However, often it brings no solution to the problem. Here we briefly summarize achievements in the mdr study and analyze our results showing that mdr may emerge due to simultaneous mutations arisen in different tightly linked genes united into a cassette. The latter may be specially localized inside the cell (we dubbed this as an envirosome) so that it faces, unlike other genes, the intracellular space and the main intracellular flux. There are ~ 100 envirosomes per cell, the chemoresistant phenotype may be due to a mutation in one of them. In case of a mutagen involved into the flux the cassette is the first to become an area of effective local mutagenesis and develops many mutations simultaneously. If the cassette codes for natively unfolded proteins and the transition disorder/order due to mutations becomes possible it may change the geometry of intracellular space and cause ligand and target sequestration, leading to the cell multiple chemoresistance).*

*О. Й. Черепенко, Д. М. Говорун*

До проблеми множинної лікарської стійкості: гіпермутабільність як механізм захисту метаболічних мішеней бактеріальної клітини від цитотоксичних ксенобіотиків

Резюме

*Множинну стійкість до ліків (МЛЮ) вивчають переважно з позицій функціонування множинних експортерів та переваження клітини білками. Проте в багатьох випадках ця проблема не знаходить свого вирішення. У представленому огляді на тлі основних досягнень вивчення МЛЮ стисло подаються власні результати виявлення МЛЮ за рахунок тісно зчеплених генів, що утворюють касети, в яких мутації виникають одночасно. Касети (на відміну від інших генів-доместосом) мають, на нашу думку, спеціальне розташування (енвіросоми), що забезпечує їхній контакт із внутрішньоклітинним простором та головним внутрішньоклітинним потоком речовин. Геном містить ~100 енвіросом і стійкість виникає, якщо хоч би в одній з них з'явилася мутація. Коли мутаген опиняється у внутрішньоклітинному потоці, касета енвіросоми першою сприймає мутагенний удар. Якщо вона кодує білки з притаманною їм природною неструктурованістю, а мутація може спричинити перехід у молекулі білка від гнучкості до жорсткості, то це може викликати зміни геометрії внутрішньоклітинного простору. Внаслідок цих змін ліганди не зможуть потрапляти до мішеней, що призведе до фенотипу множинної стійкості до ліків.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Drews J.* Genomic sciences and the medicine tomorrow // *Nat. Biotechnol.*—1996.—14.—P. 1516—1518.
2. *Bugg C., Carson W., Montgomery J.* Drug by design // *Sci. Amer.*—1993.—269.—P. 92—98.
3. *Pfost D. R.* The engineering of drug discovery // *Nat. Biotechnol.*—1998.—16.—P. 313—315.
4. *Scangos G.* Drug discovery in the postgenomic era // *Nat. Biotechnol.*—1997.—15.—P. 1220—1221.
5. *Drews J.* Drug discovery: a historical perspective // *Science.*—2000.—287.—P. 1960—1964.
6. *Torchillin V. P., Lukyanov A.* Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions // *Drug Discov. Today.*—2003.—8.—P. 259—266.
7. *Phelps M., Foraker A., Swaan P.* Cytoskeletal motors and cargo in membrane trafficking: opportunities for high specificity in drug intervention // *Drug Discov. Today.*—2003.—8.—P. 494—502.
8. *Venter J. C., Adams M., Myers E.* The sequence of the human genome // *Science.*—2001.—291.—P. 1304—1305.
9. *Lander E., Rogers J., Sulston J.* International human genome sequencing consortium initial sequencing and analysis of the human genome // *Nature.*—2001.—409.—P. 860—921.
10. *Ewing B., Green P.* Analysis of expressed sequence tags indicates 35000 human genes // *Nat. Genet.*—2001.—25.—P. 232—234.
11. *Rubinstein K.* High throughput screening: Overcoming the innovation deficit. D and MD Rpts.—London, 2000.—207 p.
12. *Hemmila I., Hurskainen P.* Novel detection strategies for drug discovery // *Drug Discov. Today.*—2002.—7.—P. S150—S156.
13. *Drews J.* Strategic trends in the drug industry // *Drug Discov. Today.*—2003.—8.—P. 411—420.
14. *Hayes J., Wolf C. R.* Molecular mechanisms of drug resistance // *Biochem. J.*—1990.—272.—P. 281—285.
15. *Bacterial resistance to antimicrobials / Ed. K. Lewis.*—New York: Marcel Dekker, Inc., 2002.—495 p.
16. *Comai L., Sen L., Stalker D.* An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate // *Science.*—1983.—221.—P. 370—371.
17. *Song S., Wientjes M., Gan Y., Au J.* Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 8658—8663.
18. *Davies J.* Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes // *Science.*—1994.—264.—P. 375—382.
19. *Ильина Т.* Структурная организация и механизмы перемещений генных касет, кодирующих резистентность к антибиотикам и факторам вирулентности бактерий // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.*—2001.—№ 1.—С. 3—12.
20. *Ковалевская Н. П.* Мобильные генные касеты и интегроны // *Молекуляр. биология.*—2002.—36.—С. 261—267.
21. *Hooper D.* Target modification as a mechanism of antimicrobial resistance // *Bacterial resistance to antimicrobials / Ed. K. Lewis.*—New York: Marcel Dekker Inc., 2002.—P. 161—197.
22. *Kishore G., Shah D.* Aminoacid biosynthesis inhibitors as herbicides // *Ann. Rev. Biochem.*—1988.—57.—P. 627—663.
23. *Padgett S. R., Re D. B., Barry G. F.* New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup ready™ gene // *Herbicide-resistant crops.*—Boca Raton: CRC publ., 1996.—P. 53—84.
24. *Nikaido H., Saier V., Jr.* Transport proteins in bacteria // *Common themes in their design // Science.*—1992.—258.—P. 936—942.

25. *Nikaido H.* Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux // *Science*.—1994.—264.—P. 382—388.
26. *Ames G. F. L., Mimura C., Shyamalo V.* Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *E. coli* humans: traffic ATPases // *FEMS Microbiol. Rev.*—1990.—75.—P. 429—446.
27. *Hyde S., Emsley P., Hartson M.* Structural model of ABC-proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport // *Nature*.—1992.—346.—P. 362—365.
28. *Ames G. F. L.* Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanisms and evolution // *Ann. Rev. Biochem.*—1986.—55.—P. 397—425.
29. *Dano K., Roninson I.* Interviews // *J. NIH Res.*—1994.—6.—P. 66—74.
30. *Holland J. B., Blight M. A.* ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organization from bacteria to humans // *J. Mol. Biol.*—1999.—293.—P. 381—389.
31. *Ставровская А. А.* Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // *Биохимия*.—2000.—65.—P. 112—125.
32. *Higgins C.* ABC-transporters: from microorganisms to man // *Ann. Rev. Cell Biol.*—1992.—8.—P. 67—113.
33. *Hopfner D. A., Delley R. G., Cole S. P. C.* Structural mechanistic and clinical aspects of MRP1 // *Biophys. et biochim. acta.*—1999.—1461.—P. 359—376.
34. *Ambdukar S. V., Dey S., Yruczyna C. A.* Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter // *Annu. Rev. Pharmacol. and Toxicol.*—1999.—39.—P. 361—368.
35. *Borst P.* Toxicological relevance of the multidrug resistance protein1 MRP1 (ABCC1) and related transporters // *Toxicology*.—2001.—67.—P. 3—23.
36. *Sung H. Le., Altenberg G.* Transport of leucotrene CH by a cysteine-less multidrug resistance protein MRP // *Biochem. J.*—2003.—370.—P. 357—360.
37. *Paulsen I., Brown M., Skurray R.* Proton-dependent multidrug efflux systems // *Microbiol. Rev.*—1996.—60.—P. 575—608.
38. *Pao S., Paulsen I., Saier V.* Major facilitator family // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*—1998.—9.—P. 263—269.
39. *Lewis K., Lomovskaya O.* Drug efflux // *Bacterial resistance to antimicrobials* / Ed. K. Lewis.—New York: Marcel Dekker, Inc., 2002.—P. 61—90.
40. *Steinrucken H., Amrhein N.* The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1980.—94.—P. 1207—1212.
41. *Pipke R., Amrhein N.* Carbon-phosphorus lyase activity in permeabilized cells of *Arthrobacter sp.* GLP-1 // *FEBS Lett.*—1988.—236.—P. 135—138.
42. *Cherepenko E. I.* Genetic mechanisms of the resistance of *E. coli* to amino acid antimetabolites // *Биополимеры и клетка*.—1997.—13.—P. 493—496.
43. *Черепенко Е. И.* Рецессивные гены хеморезистентности *Escherichia coli*, не определяющие поступление веществ в клетку // *Доп. НАН України*.—2003.—№ 2.—С. 200—203.
44. *Jeffrey C. J.* Moonlighting proteins // *Trends Biochem. Sci.*—1999.—24.—P. 8—11.
45. *Neuhard J., Nygaard P.* Purines and pyrimidines // *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology* / Ed. F. Neidhardt.—Washington: ASM press, 1987.—Vol. 1.—P. 445—473.
46. *Jochimsen B., Nygaard P., Vestergaard T.* Location on the chromosome of *Escherichia coli* of genes governing purine metabolism // *Mol. and Gen. Genet.*—1975.—143.—P. 85—91.
47. *Craig S.* Purine salvage enzymes as targets for the chemotherapeutic treatment of parasitic diseases // *Биополимеры и клетка*.—1991.—6.—P. 65—71.
48. *Cherepenko E. I., Craig S.* Genetic mechanisms of *E. coli* resistance to target inactivation: Genes governing purine metabolism in enterobacteria and an unexpected sequence found via complementation selection // *Биополимеры и клетка*.—1997.—13.—P. 403—407.
49. *Viswanathan A., Lanjuin S. L.* Identification of RNase T as a highcopy suppressor of the UV sensitivity associated with single-strand DNA exonuclease deficiency in *Escherichia coli* // *Genetics*.—1999.—151.—P. 929—934.
50. *Yavachev L., Ivanov I.* What does homology between *E. coli* tRNAs and RNAs controlling *ColE1* plasmid replication mean? // *J. Theor. Biol.*—1988.—131.—P. 131—137.
51. *Черепенко Е. И.* Предотвращение термоинактивации фенолаланил-тРНК синтетазы с помощью плазмид *ColE1* ряда // *Биополимеры и клетка*.—1994.—10.—С. 75—78.
52. *Corbin B. D., Yu X. C., Margolin W.* Exploring intracellular space: function of the Min system in round-shape *Escherichia coli* // *EMBO J.*—2002.—21.—P. 1998—2008.
53. *Sanford K., Soucaille P., Whited G., Chotani G.* Genomics to fluxomics and physiomics-pathway engineering // *Curr. Opin. Microbiol.*—2002.—5.—P. 318—322.
54. *Miller P., Rather P.* Global response systems that cause resistance // *Bacterial resistance to antimicrobials* / Ed. K. Lewis.—New York: Marcel Dekker, Inc., 2002.—P. 37—60.
55. *Ellowitz M. B., Surette M. G., Wolf R. E., Stock J. B., Leibler S.* Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.*—1999.—181.—P. 197—203.
56. *Ellis R. J.* Macromolecular crowding: obvious but underappreciated // *Trends Biochem. Sci.*—2001.—26.—P. 597—604.
57. *Fulton A.* How crowded is the cytoplasm? // *Cell*.—1982.—30.—P. 345—347.
58. *Minton A. P.* The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences // *Mol. and Cell. Biochem.*—1983.—55.—P. 119—140.
59. *Minton K. W., Karmis P., Hahn G. M., Minton A. P.* Nonspecific stabilization of stress susceptible proteins by stress-resistant proteins: a model for the biological role of heat-shock proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1982.—79.—P. 7109—7111.
60. *Zimmerman S. B., Trach S. O.* Estimation of macromolecular concentration and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli* // *J. Mol. Biol.*—1991.—222.—P. 599—620.
61. *Minton A. P.* Confinement as a determinant of macromolecular structure and reactivity // *Biophys. J.*—1992.—63.—P. 1090—1100.
62. *Minton A. P., Conclasure G. C., Parker J. C.* Model for the role and macromolecular crowding in regulation of cellular volume // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1992.—89.—P. 10504—10506.
63. *Zimmerman S. B., Minton A. P.* Macromolecular crowding: biochemical, biophysical and physiological consequences // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*—1993.—22.—P. 27—65.
64. *Ellis R. J., Hartl F. U.* Principles of protein folding in the cellular environment // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1999.—9.—P. 192—110.
65. *Ellis R. J.* Molecular chaperons: avoiding the crowd // *Curr. Biol.*—1997.—7.—P. R531—R533.
66. *Dobson C. M., Evans P., Radford S. E.* Understanding how

- proteins fold: the lysozyme story so far // *Trends Biochem. Sci.*—1994.—19.—P. 31—37.
67. Ellis R. J., Hartl F. U. Protein folding in the cell: completing models of chaperonin function // *Faseb J.*—1996.—10.—P. 20—26.
  68. Van der Berg B., Ellis R. J., Dobson C. Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation // *EMBO J.*—1999.—18.—P. 6927—6935.
  69. Sussman H. Personalized cancer vaccine promises remission // *Drug Discov. Today.*—2003.—8.—P. 657—658.
  70. Kao H. P., Abney J. R., Verkman A. S. Determinants of the translational mobility of a small solute in cell cytoplasm // *J. Cell Biol.*—1993.—120.—P. 175—184.
  71. Wright P. E., Dyson H. J. Intrinsically unstructured proteins: Reassessing the protein structure-function paradigm // *J. Mol. Biol.*—1999.—293.—P. 321—331.
  72. Dunker A. K. Intrinsically disordered proteins // *J. Mol. Graph. Model.*—2001.—19.—P. 26—59.
  73. Uverski V. Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics // *Protein Sci.*—2002.—11.—P. 739—756.
  74. Plaxco K. W., Gross M. The importance of being unfolded // *Nature.*—1997.—386.—P. 657—659.
  75. Pontius B. W. Close encounters: why unstructured, polymeric domains can increase rates of specific macromolecular associations // *Trends Biochem. Sci.*—1993.—18.—P. 181—186.
  76. Черепенко Е. И., Карпенко О. И., Малюта С. С. Генетические механизмы устойчивости клеток *Escherichia coli* к ингибиторам синтеза аминокислот // *Биополимеры и клетка.*—1994.—10.—С. 79—83.
  77. Черепенко Е. И. Множественная лекарственная устойчивость: обнаружение кассеты генов в клетках *Escherichia coli* // *Доп. НАН України.*—2002.—№ 11.—С. 163—166.
  78. Rudd K. Linkage map of *Escherichia coli* K-12. The physical map // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*—1998.—62.—P. 985—1019.
  79. Olden K., Wilson S. Environmental health and genomics: visions and implications // *Nat. Rev. Genet.*—2000.—1.—P. 149—153.
  80. Черепенко Е. И. Рекомбинация в клетках *Escherichia coli* и многообразие форм цитотоксической устойчивости // *Укр. биохим. журн.*—2003.—75.—С. 25—28.
  81. Hunter C., Mohimi S. Therapeutic synthetic polymers: a game of Russian roulette // *Drug Discov. Today.*—2002.—17.—P. 998—1001.
  82. Bogunia-Kubik I., Sugisaka M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine // *Biosystems.*—2002.—65.—P. 123—138.
  83. Koh H.-L., Yau W.-P.-L., Ong P.-S., Hedpe A. Current trends in modern pharmaceutical analysis for drug discovery // *Drug Discov. Today.*—2003.—8.—P. 889—897.
  84. Collins F., Green E., Guttmacher A., Guyer M. A vision for the future of genomic research // *Nature.*—2003.—422.—P. 835—847.
  85. *Русские подводники* / Под ред. Н. Черкашина.—М.: Вся Россия, 2003.—270 с.

УДК 575.224 + 577.352.4 + 579.252 + 615.015.8  
Надійшла до редакції 31.10.03