

## 19. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И БИОТЕХНОЛОГИИ: ГЕНОМИКА, ПРОТЕОМИКА, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, ГЕН-НАПРАВЛЕННЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

**Программа 19.1. Структурно-функциональная и сравнительная геномика и протеомика, физико-химические основы фундаментальных генетических процессов, матричный биосинтез, защитно-репарационные системы, биокатализ, трансформация энергии в биологических системах**  
(Координатор академик В. В. Власов)

В Институте химической биологии и фундаментальной медицины исследованы концентрации внеклеточных ДНК и РНК в крови здоровых доноров, больных с травмой, патологиями беременности, аутоиммунными и онкологическими заболеваниями. Впервые показано, что нуклеиновые кислоты, циркулирующие в крови, находятся не только в плазме, но и связаны с поверхностью форменных элементов крови. Оказалось, что метилированные последовательности ДНК в два—три раза чаще встречаются в составе циркулирующей ДНК, связанной с поверхностью клеток крови, чем в составе циркулирующей ДНК плазмы крови. Метилирование промоторных областей генов RASSF1A или RARβ не обнаружено в суммарной циркулирующей ДНК крови здоровых доноров, однако обнаружено у 60 % пациентов с фиброаденомой и у 95 % пациентов, больных

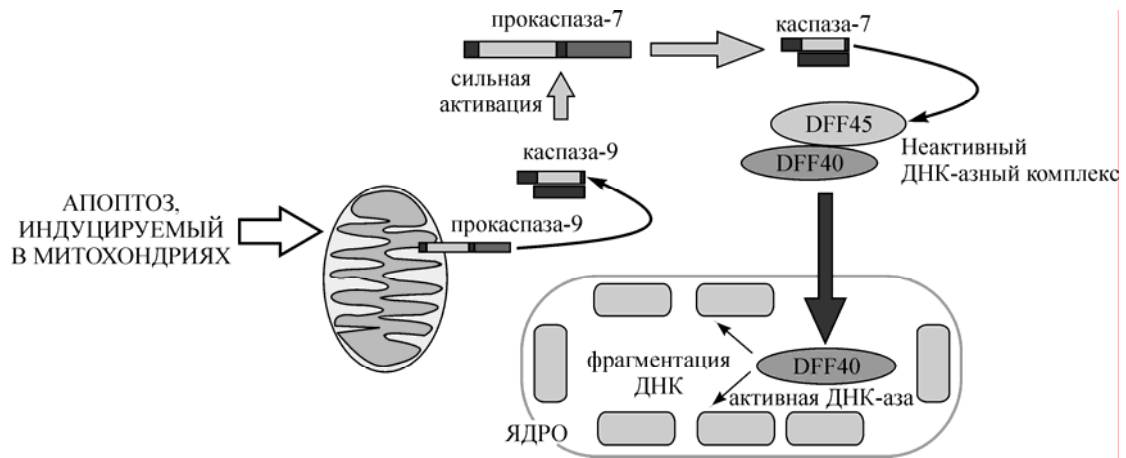
раком молочной железы. Таким образом, исследование метилирования промоторных областей генов RASSF1A и RARβ в циркулирующей ДНК крови может быть использовано для диагностики опухолей молочной железы (см. таблицу).

Учеными Института химической биологии и фундаментальной медицины предложен и экспериментально подтвержден механизм развития апоптоза (программируемой клеточной смерти) в раковых клетках молочной железы человека MCF-7, в которых отсутствует ключевой апоптотический фермент — каспаза-3. Установлено, что отсутствие каспазы-3 частично компенсируется другим ферментом — каспазой-7. Запуск апоптотического каскада происходит путем разобщения дыхательной цепи митохондрий длинноцепочечными жирными кислотами, что приводит к масштабной

Метилирование промоторных областей генов RASSF1A и RARβ в циркулирующей ДНК крови (числитель — количество пациентов, у которых метилирован промотор гена; знаменатель — общее число обследованных.  $\Sigma$ ДНК = ДНК из плазмы крови + ДНК из элюатов с поверхности клеток)

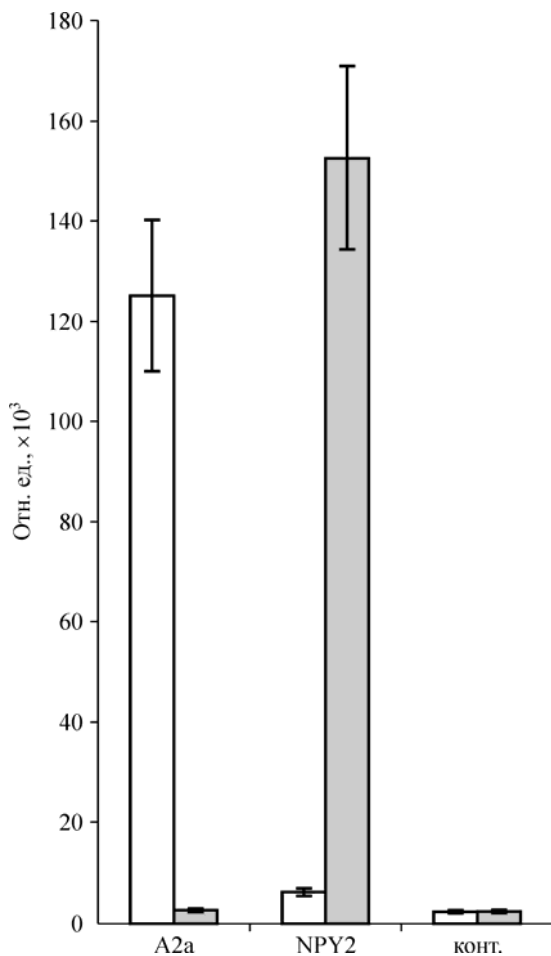
Frequency of methylation of RASSF1A and RARβ genes in circulated DNA (number of patients with methylated promoter/number of patients.  $\Sigma$ DNA = plasma DNA + cell-surface-bound DNA)

Гены	Пациенты							
	Рак молочной железы		Подозрение на рак молочной железы		Фиброаденома		Здоровые доноры	
	$\Sigma$ ДНК крови	ДНК плазмы	$\Sigma$ ДНК крови	ДНК плазмы	$\Sigma$ ДНК крови	ДНК плазмы	$\Sigma$ ДНК крови	ДНК плазмы
RASSF1A	16/20	3/20	1/5	0/5	6/10	1/10	0/8	0/10
RARβ	13/20	3/20	3/5	2/5	2/10	1/10	0/8	0/10
RASSF1A or RARβ	19/20	6/20	3/5	2/5	6/10	1/10	0	0/10



**Рис. 1.** Механизм апоптотической гибели раковых клеток посредством активации фермента каспазы-7. При нарушении функционирования митохондрий под действием жирных кислот в цитоплазме раковых клеток активируется фермент каспаза-9, которая затем активирует каспазу-7. Активная каспаза-7, в свою очередь, инициирует образование в цитоплазме и транспорт в ядро ДНК-азы DFF40. В ядре DFF40 расщепляет ДНК, что приводит к гибели раковой клетки.

**Fig. 1.** Mechanism of cancer cells apoptotic death by activation of caspase 7 was proposed. In accordance with this mechanism violation of mitochondrion functioning under fatty acids treatment leads to activation of caspase 9 enzyme. Caspase 9 activates caspase 7 which in its turn stimulates appearance in the cytoplasm and transport to the nucleus DNase DFF40. Nuclear transported active DFF40 degrades DNA that results in cell death.



**Рис. 2.** Использование люциферазы MLuc, находящейся под цАМФ-чувствительным промотором, для мониторинга активности рецепторов в CHO-клетках. Рецептор A2a ( $G_s$ -сопряженный рецептор) увеличивает внутриклеточную концентрацию цАМФ, его активация приводит к резкому увеличению активности люциферазы. Рецептор NPY2 ( $G_i$ -сопряженный рецептор) снижает концентрацию цАМФ, активация NPY2 в престаимулированных клетках с высоким уровнем цАМФ приводит к резкому снижению активности MLuc. Активность MLuc измерена либо в присутствии (белый столбик), либо в отсутствие (серый столбик) соответствующих веществ, активирующих рецепторы. конт. — контроль (клетки без генов репортеров), активность люциферазы — относительные единицы.

**Fig. 2.** The application of *Metridia longa* luciferase (MLuc) under cAMP-sensitive promotor as a bioluminescent reporter for monitoring expression of A2a and NPY2 receptors in CHO cells. The activation of A2a ( $G_s$ -coupled receptor) increases intracellular cAMP concentration and therefore MLuc activity. The activation of NPY2 ( $G_i$ -coupled receptor) decreases intracellular cAMP concentration and therefore its activation in prestimulated cells with the high cAMP concentration results in decrease of the MLuc activity. The MLuc activity was measured with (white bars) and without (gray bars) the compounds activating the receptors. конт. — control, luciferase activity — relative light units.

активации каспазы-7 и к олигонуклеосомной фрагментации ДНК раковых клеток. Полученные результаты важны для разработки подходов к терапии опухолей эпителиального происхождения (рис. 1).

В Институте биофизики клонирована кДНК, кодирующая новую секретлируемую целентеразинзависимую люциферазу светящихся морских копепод *Metridia longa*, определена ее нуклеотидная последовательность, по которой восстановлена аминокислотная последовательность белка. Сравнение аминокислотной по-

следовательности люциферазы *Metridia longa* не выявило какой-либо значимой гомологии с белками, депонированными в белковых базах данных, включая биолюминесцентные белки других светящихся организмов, использующих целентеразин как субстрат реакции. На примере генов, кодирующих рецепторы A2a и NPY2 (семейство G-связанных рецепторов), показана перспективность использования этой люциферазы как секретлируемого репортерного белка для мониторинга экспрессии генов в животных клетках (рис. 2).

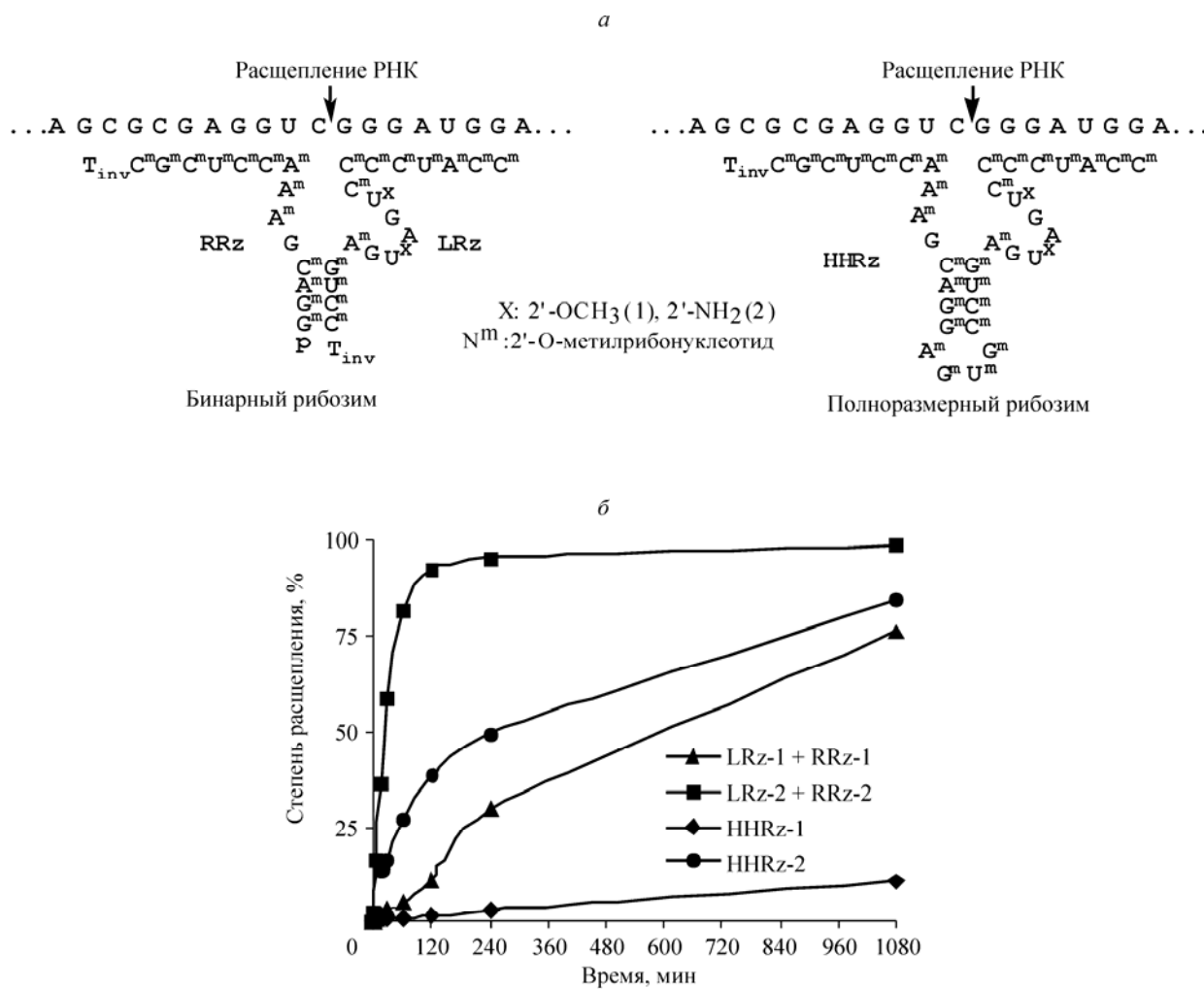
**Программа 19.2. Биотехнологии создания генетически модифицированных организмов и биологически активных веществ: средств генотерапии, вакцин, иммуномодуляторов, противоопухолевых и противовирусных препаратов, модифицированных ферментов и биоматериалов для клеточной и тканевой биоинженерии**  
(Координатор академик В. К. Шумный)

В Институте химической биологии и фундаментальной медицины впервые созданы бинарные рибозимы, состоящие из коротких синтетических олигонуклеотидов. Замена протяженного полноразмерного рибозима двумя короткими олигомерами упрощает синтез и выделение рибозимных конструкций, а также повышает их каталитическую активность за счет ускорения диссоциации продуктов расщепления РНК из комплекса с рибозимом. Для повышения стабильности бинарных конструкций использована замена всех неконсервативных рибонуклеотидов в составе рибозима их 2'-модифицированными аналогами в сочетании с модификацией 3'-конца каждой олигомерной цепи (рис. 3, а). Показано, что модифицированные бинарные рибозимы, в отличие от полноразмерных рибозимов, проявляют высокую каталитическую активность при расщеплении структурированного 190-звенного 5'-концевого фрагмента мРНК гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 (рис. 3, б). Созданные бинарные конструкции могут рассматриваться как потенциальные ингибиторы экспрессии генов на уровне мРНК и противовирусные соединения.

С целью получения белков человека в молоке трансгенных животных в Институте цитологии и генетики созданы две конструкции, содержащие полноразмерный ген гранулоцит-колониестимулирующий фактор человека

(Г-КСФ), слитый с 5'- и 3'-фланкирующими промоторными последовательностями гена альфа-S<sub>1</sub>-казеина (CSN1S1) коровы. С обеими конструкциями получены трансгенные мыши, и экспрессия трансгенов была оценена с помощью ОТ-ПЦР и иммунохимически по продукции Г-КСФ человека в молоке лактирующих самок мышей (рис. 4). Секрета Г-КСФ человека в молоко варьировала в широких пределах — от 0,8 мкг/мл до 1 мг/мл. Показано, что Г-КСФ молока трансгенных мышей стимулирует образование и рост гранулоцит-содержащих колоний в культуре клеток пуповинной крови человека и, следовательно, близок или идентичен по физиологической активности натуральному Г-КСФ человека.

Для биомедицинских применений из высокоочищенных образцов полигидроксиалканоев (ПГА), синтезированных в Институте биофизики, получены биоактивные конструкции мембранного и объемного типов в виде гранулята, микрочастиц и компактов, в том числе нагруженные лекарственными препаратами (рис. 5). Разработаны и зарегистрированы в Госстандарте РФ технические условия ТУ 2200-001-03533441-2004 «Сополимер оксимасляной и оксивалериановой кислот, предназначенный для использования в качестве полимерной основы для депонирования лекарственных препаратов, матриц культивирования клеток и упаковочного материала».

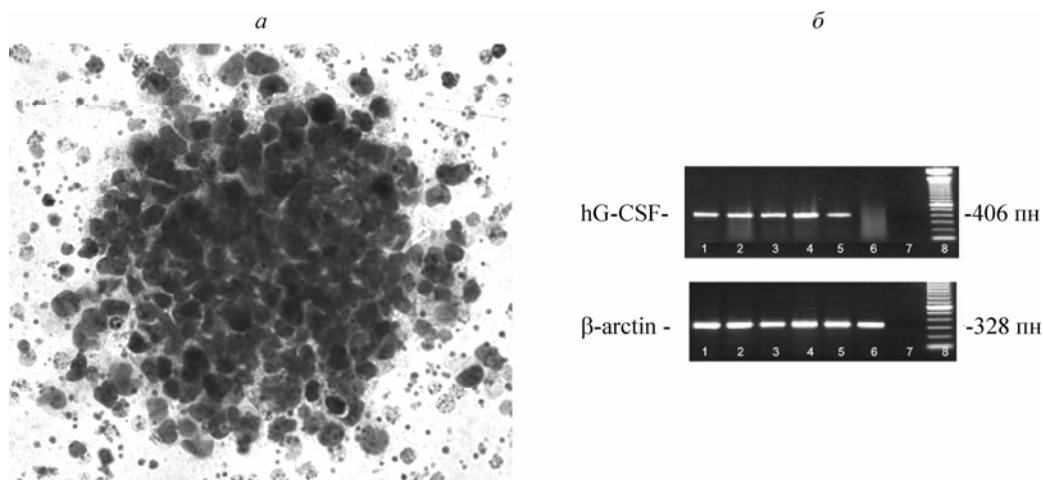


**Рис. 3.** Расщепление 190-звенного фрагмента MDR1 мРНК модифицированными бинарными каталитическими РНК-рибозимами и их полноразмерными аналогами.

*a* — структуры полноразмерного (HHRz) и бинарного рибозимов, состоящих из двух фрагментов RRz и LRz (нижние цепи), связанных с расщепляемой РНК (верхние цепи); *b* — расщепление РНК в каталитическом режиме: [RRz] = 0,5 мкМ, [LRz] = 0,1 мкМ, [HHRz] = 0,1 мкМ. Условия расщепления: 37 °С; 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мкМ РНК.

**Fig. 3.** Cleavage of 190-nt MDR1 mRNA fragment by modified binary ribozymes and their full-length analogs.

*a* — structures full-length ribozymes (HHRz) and binary ribozymes composed of two fragments RRz and LRz (lower chains) bound to the RNA target (upper chains); *b* — RNA cleavage in multiple turnover mode: [RRz] = 0.5 μM, [LRz] = 0.1 μM, [HHRz] = 0.1 μM. Cleavage conditions: 37 °C; 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM RNA.

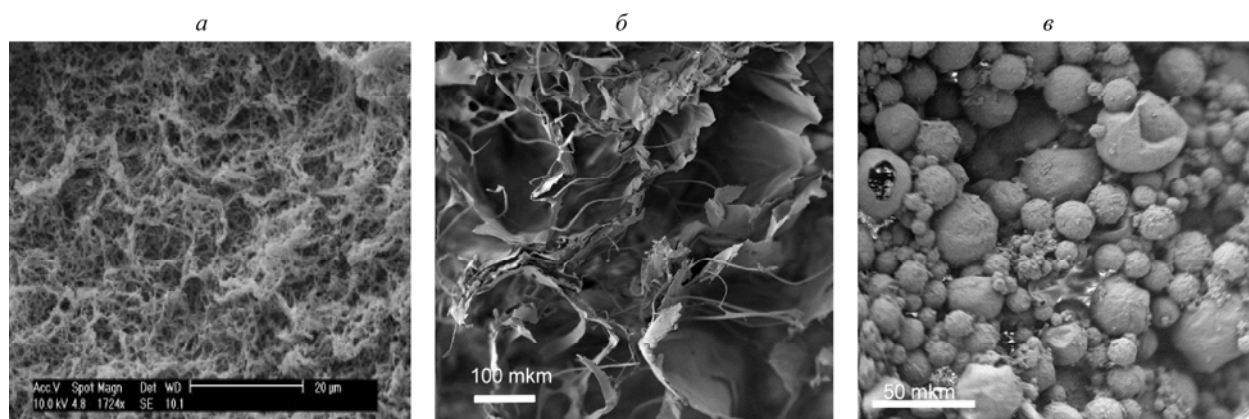


**Рис. 4.** Создание трансгенных мышей, несущих ген гранулоцит-колониестимулирующий фактор человека.

*a* — колония зрелых и незрелых клеток гранулоцитарного ряда в полужидком агаре, образовавшаяся из клеток-предшественников пуповинной крови человека после добавления молока трансгенной самки, разведенного в 30000 раз; *b* — результаты анализа экспрессии гена Г-КСФ (hG-CSF) (верхний) и гена бета-актина ( $\beta$ -actin) (нижний) с помощью ОТ-ПЦР в молочной железе трансгенных (1—5) и нетрансгенной (6) самок; негативный контроль, без РНК (7), справа — молекулярный маркер с шагом 100 пн (8).

**Fig. 4.** Production of transgenic mice with the human gene coding granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF).

*a* — a colony of mature and immature granulocyte cells in semisolid agar that was formed from precursors of human umbilical cord blood after addition of milk of a transgenic female in the semisolid agar. The milk was diluted in 30000 fold; *b* — analysis of expression of the human hG-CSF gene (top) and the gene for beta-actin (bottom) by RT-PCR in mammary glands from transgenic (1—5) and non-transgenic (6) females; a negative control without RNA (7), on the right — ladder 100 bp (8).



**Рис. 5.** Биомедицинские конструкции из ПГА: *a* — пористая мембрана; *b* — трехмерная губка (scaffold); *в* — микрочастицы.

**Fig. 5.** Biomedical PHA constructions: *a* — porous membrane; *b* — 3-dimensional sponge (scaffold); *в* — microparticles.