

Наши гены — наши друзья или наши враги — как в этом разобраться?

И. Григорян



Ирина Григорян
Хотя и не училась в биоклас-
се, но традиционно принад-
лежит к «Терапсидам»,
закончила кафедру эмбрио-
логии Биофака МГУ
(1989 г.), к.б.н., работает в
компании LabNext Inc. *,
poetry29@yahoo.com

В геноме живых организмов насчитывают до 40 000 различных генов, как постоянно активных, так и находящихся в те или иные периоды в малоактивном, латентном, состоянии. Для молекулярного биолога и молекулярного генетика важно как можно больше знать хотя бы о тех генах, которые находятся в активном состоянии, знать функцию белков, которые они кодируют, постоянна ли она или переменна, помогает она организму или мешает. Интересно, что может происходить и то и другое. А поскольку нежелательные для организма процессы так или иначе приводят к заболеваниям, важно и нужно знать, какие гены — всегда наши друзья, какие — наши враги, а какие могут менять свое «лицо» в зависимости от места и времени проявления.

Один и, пожалуй, самый яркий пример такого поведенческого «хамелеона» — ген p53 или, как его любят называть, — сторож нашего генома, или, еще более интригующе, — ген совести. Что же это за ген и почему он сторож и совесть клетки? Открытый в 1979 г., ген p53 в представлении ученых претерпел столько качественных

изменений касательно его функции и значения в клетке и организме, что просто сам рассказ об этих превращениях мог бы стать замечательной иллюстрацией того, как развитие науки и расширение ее технических возможностей для изучения тех или иных явлений и процессов влияет на наши знания о самих этих явлениях.

Ядерный белок p53 был открыт в составе комплекса с другим белком, большим Т-антигеном вируса SV-40, в клетках, трансформированных этим вирусом. Довольно быстро стало ясно, что p53 не только экспрессируется на высоком уровне практически во всех типах опухолей разной локализации, но и присутствует в небольших количествах в нормальных клетках. Уровень белка p53 в нормальных клетках невысок. Поскольку одним из самых ярких способов обнаружить функцию нового гена является его нокаут, т.е. получение трансгенных животных, в которых ген p53 удален по обоим аллелям, были получены мыши без p53, которые внешне ничем не отличались от тех своих собратьев, у которых p53 функционировал в норме. То есть присутствие p53, казалось бы, не является необходимым для нормального роста и развития. Вместе с тем у таких мышей наблюдалась высокая частота возникновения опухолей, что говорило о том, что нарушен какой-то основной механизм защиты организма от возникновения спонтанных злокачественных новообразований.

В 1982 г. была проклонирована кДНК и определена первичная последовательность гена p53 мыши. Клонирование p53 дало возможность более детального изучения функции как самого гена, так и его белкового продукта. Некоторые различия в опубликованных кДНК последовательностях позднее объяснились тем, что одни ученые клонировали и определяли последовательность гена дикого типа, а другие — мутантного, т.е. измененного. Вот в этом мутантном гене и оказалась «собака зарыта». Основной функцией p53 «дикого типа» является охрана клетки, ее здорового генетического материала. Если у клетки все хорошо, то содержание в ней белка гена p53 невелико (порой даже с трудом поддается обнаружению) и регулируется постоянным процессом его деградации в специаль-

* В 1989–1992 гг. работала в лаборатории молекулярной генетики НИИ канцерогенеза, где защитила диссертацию по теме «Тканевая специфичность экспрессии ретровирусов птиц», затем — в Париже, в лаборатории «Ретровирусов и ретротранспозонов» (1992–1994 гг.). В 1995–2003 гг. — на кафедре молекулярной генетики Иллинойского университета в Чикаго в лаборатории Андрея Гудкова, занималась опухолевыми супрессорами и онкогенами. В настоящее время работает в компании, специализирующейся на оборудовании для изготовления и обработки биочипов.

ных органеллах — протеосомах. Такая форма p53, когда он находится в нормальной здоровой клетке в небольших, постоянно обновляемых количествах, называется неактивной, или латентной, формой p53. Латентный p53 не способен влиять на другие гены, что в иной ситуации становится одной из самых главных функций p53.

Когда клетка или организм в целом испытывают любого вида затруднения или стресс, начиная с увеличения температуры тела во время загара и заканчивая повреждениями ДНК химическими агентами, ультрафиолетовыми или рентгеновскими лучами, во-первых происходит накопление белкового продукта гена p53 за счет остановки его деградации, а также качественные химические изменения различных участков белка в результате процессов фосфорилирования, дефосфорилирования, ацетилирования, гликозилирования и образования комплексов связывания с другими белками клетки. Эти и связанные с ними процессы приводят к тому, что повреждения в ДНК устраняются, и пролиферация мутантных клеток предотвращается.

Если же повреждения настолько серьезные, что сам по себе ген p53 и его «связи» не способны вылечить поврежденную клетку, то тот же самый p53, действуя сам и через своих сообщников — p53-зависимых генов, запускает каскад событий, который называется апоптоз — запрограммированная гибель клеток. Морфологически апоптоз наблюдается в виде сморщивания клеток, конденсации хроматина и фрагментации ядер. Последующее поглощение таких клеток фагоцитами в отличие от некроза не сопровождается воспалением. Запуск и протекание апоптоза регулируется p53 через его действие на другие клеточные гены, например BAX или WAF.

Такова одна из многих функций нормально-го p53 гена, и именно поэтому его и называют стражем генома или совестью клетки. В таком своем «обличье» он — наш друг, а вот измененный, мутантный, p53, на описанный выше стресс-ответ не способен. И вот тут он способен стать врагом клетки. Оказалось, что в половине всех злокачественных новообразований, опухолей человека и животных, p53 утерян или присутствует в дефектном или мутантном виде, который уже не способен к устранению повреждений или запуску апоптотического механизма смерти клетки. Отсутствие нормально функционирующего p53 приводит к быстрой прогрессии опухоли и устойчивости ее к антираковой терапии, а также в целом к нестабильности генома. Из этого следует, что легче поддаются лечению опухоли с диким p53, где его присутствие под влиянием

химиотерапии или облучения запускает или индуцирует апоптоз.

Однако тут возникает основной вопрос химио- и радиотерапии: ну хорошо, мы имеем опухоль с диким p53, и данный больной скорее всего прямой кандидат на успешное лечение. Но ведь организм этого больного состоит не только из опухолевых, но и из нормальных клеток, которые под воздействием тех же химиопрепаратов или рентгеновских лучей тоже погибнут, ослабляя организм в целом. И, что особенно тяжело, в ходе лечения таких больных подобная массовая гибель здоровых клеток в различных органах вызовет серию неприятных явлений, которые в клинике называют побочными эффектами химиотерапии. Почти в 100% случаев необходимое лечение приходится останавливать временно или совсем прекращать именно из-за того, что организм не выдерживает этих побочных эффектов, и на фоне основного заболевания развиваются второстепенные, порой несовместимые с жизнью. Известно, что у мышей наиболее высокая активность p53 наблюдается в лимфатических и кроветворных органах и именно эти органы наиболее чувствительны к противоопухолевой терапии. Получается, что в данном случае p53 уже не друг, а враг?

Однако именно свойство p53 как главного виновника токсических эффектов противораковой терапии было «использовано» в поиске метода уменьшения гибели нормальных клеток в процессе химио- и радиотерапии. Ведь если попытаться выключить (хотя бы на время) p53 в клетках, свободных от болезни, то тогда на злокачественные клетки можно действовать самыми высокими дозами препаратов или облучения, сохраняя остальные органы и ткани живыми и здоровыми, а пациента избавляя от мучительных по ощущениям побочных эффектов.

Исследования в области регуляции p53 и его активации при стрессовом ответе привели к поиску химического соединения, способного временно выключать ген p53 и таким образом спасать здоровые клетки от гибели под воздействием химиотерапевтического препарата или облучения. Одно из таких соединений под названием ПИФИТРИН (от p53 inhibitor) было найдено в 1999 г. в лаборатории Андрея Гудкова в Чикаго.

Интересен был экспериментальный подход. Библиотека из нескольких тысяч химических соединений была протестирована на способность временно подавлять функцию p53 гена. В 96-луночных плашках росли клетки, в которых ген цветовой окраски находился под контролем p53 зависимого промотора. Клетки обра-

батывали адриамицином (лекарством, которое активирует p53) в присутствии различных соединений из химической библиотеки. В тех лунках, где добавленное химическое соединение не препятствовало активации p53, клетки становились голубыми после окрашивания на бета-галактозидазу (белок цветовой окраски); и только лунка, содержащая пифитрин, после активации адриамицином на окрашивание не прореагировала, что позволило предположить, что именно данное химическое соединение способно эффективно подавлять p53.

Механизм работы пифитрина до конца не ясен; экспериментально показано, что он препятствует миграции вновь синтезированного белка из цитоплазмы в ядро и таким образом выполнению p53 своих функций как индуктора апоптоза. Если мышам с нормальным p53 за час до облучения ввести внутривенно пифитрин, то они, в отличие от контрольных животных, переживают летальную дозу облучения и гораздо меньше теряют в весе. На клеточном уровне наблюдается похожая картина: 10 мкМ (микроМоль, 10^{-6} Моль) концентрации пифитрина достаточно, чтобы мышинные и человеческие фибробласты избежали апоптоза, вызываемого облучением или сильными химиотерапевтическими препаратами, такими как таксол, этопозид или адриамицин. То, что эффект данного химического соединения связан именно с ингибированием p53, ясно из опытов с клетками и мышами, нокаутами по p53, где данный эффект выживания от летальных доз облучения пропадает. Таким образом, данный препарат является прямым кандидатом на применение в качестве сопутствующей терапии при особо злокачественных опухолях, что позволит вести лечение высокими дозами химиопрепаратов или радиооблучения, защищая при этом непораженные и особенно чувствительные органы и ткани.

Сейчас ведется поиск химических аналогов пифитрина, не обладающих токсичностью для человеческого организма, и сохраняющих при этом способность эффективно подавлять p53 на время ведения необходимого лечения. Но замечательно уже то, что открытие пифитрина показало, что, модулируя, изменяя стресс-ответ p53, можно не только повышать эффективность химиотерапии, но и защищать другие органы и ткани, в которых активация p53 в ответ на стресс, нежелательна. Примером является ишемия клеток сердечной мышцы и мозга, когда активация p53 в ответ на локальную гипоксию (недостаток кислорода) приводит к губительной для этих органов и организма в целом массовой апоптотической гибели клеток.

Интересно, что p53 выполняет свои функции стража генома не только и не столько сам по себе, сколько через «своих друзей и сподвижников». Стресс-ответ p53 происходит через запуск каскада генов, зависимых от p53, экспрессия которых повышается или понижается в зависимости от происходящих в клетке процессов. И таких генов великое множество. Помимо гена Mdm2, обеспечивающего регуляцию самого p53 (его деградацию и поддержание в клетке на постоянном уровне) идентифицировано более сотни генов, являющихся мишенями транскрипционных активностей p53. Они могут быть разделены на несколько групп, исходя из их физиологических функций: это гены, регулирующие клеточный цикл (WAF-1, GADD45 и др.), белки, индуцирующие апоптоз (BCL2, BAX, PUMA, PIG3 и др.), контролирующие прорастание сосудов (VEGF, TSP-1, HIF-1), и, наконец, гены, продукты которых регулируют морфологию и миграцию клеток (β -актин, фибронектин и др.).

Некоторые из p53 зависимых генов настолько тесно связаны с p53, что их независимое функционирование невозможно. Интересным в этом отношении является недавно открытый новый опухолевый супрессор p33 или ING-1. Биологические эффекты p33 и p53 взаимосвязаны и требуют активности обоих генов. На клеточном уровне это означает, что если один из генов блокирован, т.е. его активность подавлена или временно отключена, второй проявляет себя во много раз слабее или не проявляет совсем. Данные, полученные в ходе исследований, свидетельствуют о том, что белки p33 и p53 физически взаимодействуют, формируя сложный комплекс. Кроме того, p33 не может препятствовать размножению клеток опухоли, когда в них не хватает p53. И наоборот, способности белка p53 к подавлению роста клеток снижаются, если активность p33-ING1 понижена или блокирована. Таким образом, гены p53 и p33, по всей видимости, принадлежат к одному сигнальному пути и играют «в одной команде», выполняя функцию регуляции процессов апоптоза, клеточного старения и защиты клеток от опухолевого перерождения.

Подобных примеров сложного и порой запутанного взаимодействия генов в клетке немало, и почти всегда во взаимодействии при каком-либо биологическом процессе, будь то реакция организма на тот или иной лекарственный препарат или превращение клетки из нормальной в раковую, участвуют не один и не два гена, а десятки и сотни. Только по поведению нескольких генов невозможно получить полную картину происходящего процесса. А сравнивать экспрессии по

одному гену в одной реакции по гибридизации РНК (Нозерн-блот гибридизации) — это долговременная и трудоемкая процедура. Поэтому исследователей давно интересовало, как сделать так, чтобы в одном эксперименте увидеть взаимодействие и активность десятков и даже сотен генов одновременно. Это особенно важно при исследованиях эффекта того или иного нового лекарственного препарата, его влияния на организм и отдаленных по времени последствий, когда важно выяснить, какой генетический каскад событий при этом индуцируется.

Замена Нозерн-блот гибридизации (когда на нитроцеллюлозу наносится РНК, выделенная из клеток, подвергшихся действию какого-то препарата, и гибридизуется с пробой того или иного — но только одного в одном эксперименте — гена) была придумана сравнительно недавно, около 10 лет назад, в виде технологии биочипов (microarray technology). Эта технология, простая и красивая по своей задумке и имеющая много подводных камней в реальном исполнении, произвела поистине революционный переворот в биологии и медицине.

Остановимся поподробнее на основной схеме по приготовлению и обработке биочипа. Точнее, на одной из его форм — кДНК биочипе (кДНК это ДНКовая копия клеточных РНК). Биочипы по природе нанесенного на подложку материала исторически делятся на две основные формы — «олигонуклеотидные», когда на специально обработанную поверхность наносятся короткие, 20–60 нуклеотидов, фрагменты ДНК (по несколько для каждого гена); и биочипы на основе кДНК, когда робот наносит на стекло фрагменты длиной до 1000 нуклеотидов, обычно соответствующие кДНК данного гена.

Представим, основываясь на примере с р53, что нам надо проследить реакцию всех генов, зависимых от р53, которые увеличивают или уменьшают свою активность в ответ на облучение или обработку клеток тем или иным лекарственным препаратом. Таких генов можно считать около 200.

Интересующие нас фрагменты кДНК каждого гена специальным роботом наносятся в виде точек на предметные стекла, химически активные в отношении связывания молекул ДНК. Таких стекол с точно заданным месторасположением фрагментов генов можно напечатать сколько угодно, а достаточное количество молекул кДНК каждого гена создаются в процессе полимеразной цепной реакции (PCR), или амплификации.

После того, как генетический материал нанесен на стекло, иначе говоря «напечатан» и химически к нему пришит, начинается собствен-

но сам процесс биочиповой гибридизации. Идея состоит в том, чтобы сравнить, как изменилась экспрессия тех или иных генов после обработки клеток, например адриамицином. Значит, нам необходима РНК не только из клеток, обработанных лекарством, но и из нормальных, контрольных, клеток. Как проявился, или проэкспрессировался, тот или иной ген, станет ясно в результате гибридизации — процесса, основанного на правиле образования комплементарных пар между одноцепочечными фрагментами ДНК на стекле и пробы из раствора, в который помещают стекло с напечатанным биочипом.

Пробы в растворе — это те самые РНК из обработанных адриамицином (опыт) и необработанных (контроль) клеток. При приготовлении проб в реакцию добавляют флуоресцентные красители, сложные химические соединения, цианиды, которые прикрепляются к нуклеотидам пробы. Существует множество красителей, отличающихся диапазоном волн излучаемого света (или попросту цветом). Использование красителей разного цвета (например, красного Су5 и зеленого Су3) для маркировки РНК из проб опыта и контроля позволяет проводить сравнение экспрессии генов на одном и том же стекле, в одном и том же эксперименте.

Итак, в ходе реакции гибридизации молекулы каждого типа РНК пробы связываются (в лучшем случае) с единственным типом молекул из зафиксированных на биочипе. Те молекулы, которые не связались, смываются, а связавшиеся светятся одновременно двумя цветами, причем соотношение интенсивности красного и зеленого цветов, которое определит лазерный сканер, будет соответствовать соотношению количества РНК в двух пробах. Это соотношение и будет являться тем самым изменением экспрессии генов в клетках после обработки их лекарственным препаратом.

Картину поверхности стекла с нанесенным биочипом получают в многоканальном лазерном сканере, где каждый канал настроен на длину волны соответствующего маркера, краски. Точки, обозначающие гены, интенсивность свечения которых в красном и зеленом свете будет одинакова, — это гены, уровень активности которых после воздействия лекарства не изменился (серый цвет точек). Гены же, уровень экспрессии которых увеличился или уменьшился, будут ярко-зелеными или ярко-красными (рисунки 1 и 2).

Цветовые характеристики каждой точки получают свои числовые выражения, которые и являются определяющими при сравнении экспрессии различных точек-генов. На следующем этапе обработки полученных данных гены

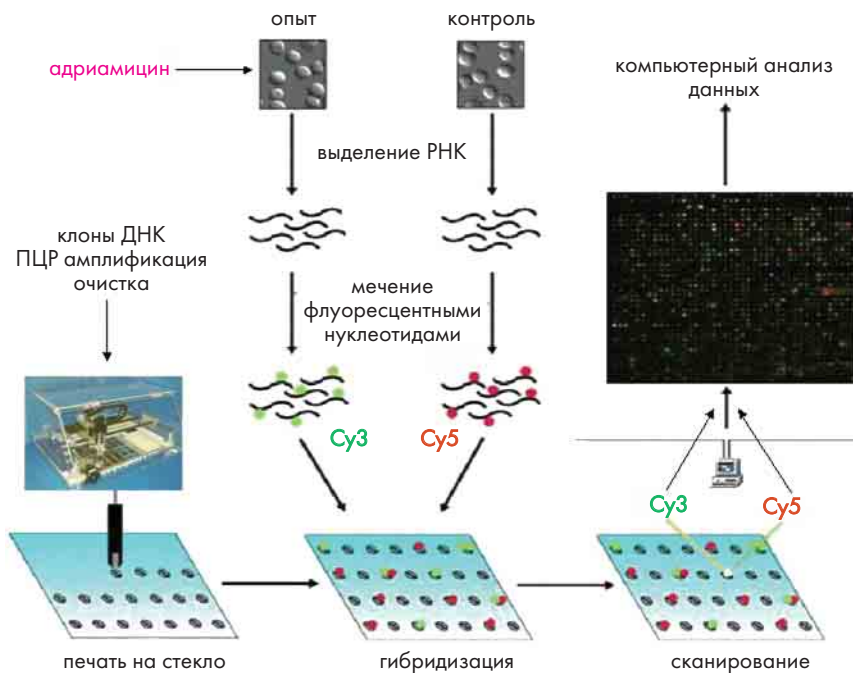


Рисунок 1. Схема приготовления и обработки био-чипа.

объединяют в группы, или кластеры, по схожести изменению уровня экспрессии. Это делается с помощью компьютерных программ сравнения биочиповых данных и на основе биологических знаний о каждом конкретном гене и взаимодействии генов друг с другом. Обнаружение подобных кластеров — это начало формирования новых взглядов на заданную биологическую проблему на основе взаимовлияния генов и

изменения их экспрессии под воздействием тех или иных факторов. Например, в рассмотренном выше эксперименте были найдены группы генов, зависимые от p53 и принадлежащие к различным группам по типу контролируемых ими процессов. Некоторые из белков, продуктов этих генов, могут быть использованы в химиотерапии раковых опухолей, если изменение их активности, как в случае p53 и пифитрина, может принести пользу клетке и организму в целом.

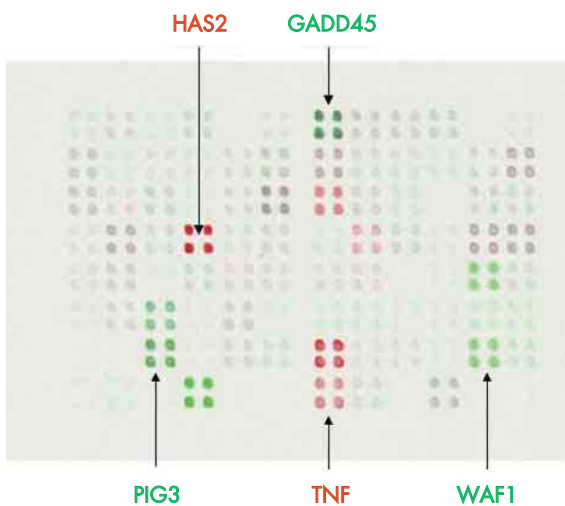


Рисунок 2. Фрагмент изображения био-чипа, прошедшего гибридную РНК из клеток мышинных фибробластов, обработанных адриамицином, в сравнении с необработанными нормальными мышинными фибробластами. Точки, обозначающие гены, уровень экспрессии которых после воздействия адриамицина не изменился, выглядят серыми; гены, уровень экспрессии которых возрос, — зелеными, уменьшился — красными.

На один чип, на одно стекло, можно поместить, к примеру, весь мышинный геном. И таким образом всего за один-два эксперимента определить, какие группы генов ведут себя одинаково, а какие — по-разному в разных условиях, таких как этапы эмбрионального развития и дифференцировки; стадии лечения, ремиссии или рецидива того или иного заболевания; во время, до и после введения в организм того или иного лекарства.

За 10 лет с момента создания биочиповой технологии появилось множество ее вариантов: уже созданы белковые чипы и даже тканевые чипы, когда срезы с обычных гистологических парафиновых или креостатных блоков одного или многих органов и тканей переносятся на одно и то же стекло и анализируются с помощью как гистохимического и иммунологического окрашивания, так и гибридной РНК (*in situ* (рисунок 3)). Нетрудно вообразить, насколько более экономичен и информативен такой метод, особенно если речь идет о биопсийном (т.е. взятом от больных) материале, количества которого всегда ограничены.

От определения взаимодействия генов до ранней диагностики тяжелых и опасных заболеваний, таких как лейкозы и другие формы опухолевой трансформации, — таковы еще не вполне исчерпанные и перечисленные возможности этой красивой и на первый взгляд простой технологии.

Литература

Cheung V.G., Morley M., Aguilar F., Massimi A., Kucherlapati R., Childs G. 1999. Making and reading microarrays // *Nat. Genet.*, 21 (1 suppl.): 15–19.

DeRisi J., Penland L., Brown P.O., Bittner M.L., Meltzer P.S., Ray M., Chen Y., Su Y.A., Trent J.M. 1996. Use of a cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer // *Nature Gen.*, 14: 457–460.

Grigorian I.A., Garkavtsev I., Ossovskaia V.S., Chernov M.V., Chumakov P.M., Gudkov A.V. 1998. The candidate tumor suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control // *Nature*, 391: 295–298.

Komarov P.G., Komarova E.A., Kondratov R.V., Christov-Tselkov K., Coon J.C., Chernov M.V., Gudkov A.V. 1999. A Chemical Inhibitor of p53 That Protects Mice from the Side Effects of Cancer Therapy // *Science*, 285: 1733–1737.

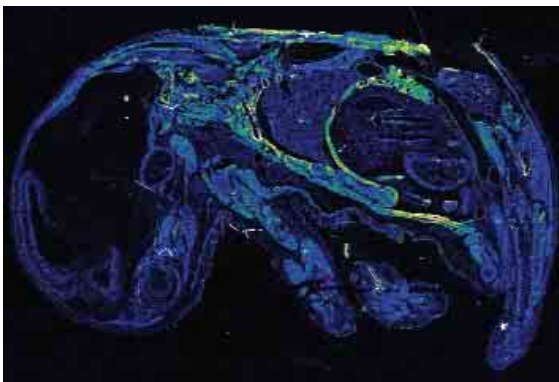


Рисунок 3. Возможности биочиповой технологии. Гистоблот мышиноного эмбриона. Гибридизация с помеченной Су3 (зеленая краска) кДНК актина.

Lane D.P. 1994. The regulation of p53 function: Steiner Award Lecture // *Int. J. of Cancer*, Jun 1; 57(5): 623–627.

Lowe S.W., Cepero E., Evan G. 2004. Intrinsic tumour suppression // *Nature*, 432: 307–315.

Lee J.K., Bussey K.J., Gwadry F.G., Reinhold W., Riddick G., Pelletier S.L., et al. 2003. Comparing cDNA and oligonucleotide array data: concordance of gene expression across platforms for the NCI-60 cancer cells // *Genome Biol.*, 4 (12): 53.

Vousden, K.H. 2000. Death star // *Cell*, 22: 691–694.