

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
И ГЕНЕТИКИ НАН УКРАИНЫ

Е.И. ЧЕРЕПЕНКО

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ
ЗАЩИТНЫЕ
МЕХАНИЗМЫ
КЛЕТКИ
И ФАРМАКОТЕРАПИЯ**

*ПРОЕКТ
«НАУКОВА КНИГА»*

КИЕВ НАУКОВА ДУМКА 2012

В монографии суммированы данные изучения механизмов защиты клетки от действия лекарства. Эти механизмы, использующие как отдельные молекулы клетки, так и внутриклеточные системы молекул, обеспечивают изменение, разрушение структуры лекарства, обособление его в клетке, выведение из клетки и другие процессы. Для бактерий описаны регулоны защитного действия. Показана роль в фармакотерапии мобильных генетических элементов, анеуплоидии, регуляторных сигналов, регуляторов клеточного цикла, программы смерти клетки. Раскрыта защитная роль малых молекул РНК — miR и эпигенетического состояния генов. Рассмотрены перспективы в фармакотерапии нанотехнологий и системной биологии. Приведены исследования автора о роли плотности упаковки структур клетки в возникновении ее хемоустойчивости.

Для широкого круга биологов и медиков, а также студентов по этим специальностям.

У монографії узагальнено дані вивчення механізмів захисту клітини від дії ліків. Ці механізми, що використовують як окремі молекули клітини, так і внутрішньоклітинні системи молекул, забезпечують зміну, руйнацію структури ліків, їхнє виокремлення всередині клітини, виведення з клітини тощо. Для бактерій описано спеціальні захисні регулони. Показано роль у фармакотерапії мобільних генетичних елементів, анеуплоїдії, регуляторних сигналів, регуляторів клітинного циклу, програми смерті клітини. З'ясовано захисну роль малих РНК — miR та епігенетичного стану генів. Розглянуто перспективи у фармакотерапії нанотехнологій та системної біології. Наведено дослідження автора щодо ролі щільності пакування структур клітини у виникненні її хемостійкості.

Для широкого кола біологів і медиків, а також студентів, які навчаються за цими спеціальностями.

Рецензент член-корреспондент НАН України,
профессор Н.Я. СПИВАК

*Утверждено к печати ученым советом
Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины
(протокол № 6 от 12 апреля 2011 г.)*

***Видання здійснено за державним замовленням
на випуск видавничої продукції***

Научно-издательский отдел медико-биологической,
химической и геологической литературы

Редактор *Н.С. Колосок*

© Е.И. Черепенко, 2012

© НПП «Издательство “Наукова думка”,
НАН України», дизайн, 2012

ISBN 978-966-00-1264-6

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Г л а в а 1. Как изучение возникновения хемотройчивости вышло на уровень генетической организации клетки	12
Г л а в а 2. О генетических и биохимических процессах клетки, нивелирующих действие мишенных лекарств	14
2.1. О транспорте вещества в клетку и из клетки.....	15
2.1.1. АТФ-зависимые множественные АВС-экспортеры.....	20
2.1.2. Протонзависимые множественные экспортеры.....	22
2.1.3. SLC-переносчики, ответственные за поступление малых молекул в клетку	26
2.2. О детоксикации ингибиторов в клетке: гидролиз соединений и их химическая модификация	29
2.3. О секвестрации лекарства в клетке, предотвращающей его взаимодействие с мишенью.....	29
2.4. Мутирование молекулы-мишени действия ингибитора в участке его связывания и увеличение концентрации мишенных сайтов	30
2.5. Об обходных путях метаболических блоков в клетке и структурной мимикрии сайта связывания лиганда	32
2.6. О белково-белковой защите в клетке молекулы-мишени действия- лекарства	34
2.7. О биопленках	39
Г л а в а 3. Системы глобального ответа клетки, обуславливающие ее противохимическую защиту	42
Г л а в а 4. Цитотоксические лекарства и защитный ответ клетки на стресс: I. Мобильные генетические элементы, перестройки генома, анеуплоидия и хемотройчивость	50
4.1. Самоорганизующиеся системы хемотройчивости: мобильные генетические элементы и возникновение лекарственной устойчивости.....	52
4.1.1. Краткая характеристика МГЭ прокариот	55
4.1.2. Краткая характеристика МГЭ эукариот.....	59
4.2. О поведении МГЭ и возникновении хемотройчивости клетки	62
4.3. Анеуплоидия и множественная лекарственная устойчивость при раке.....	64

Глава 5. Цитотоксические лекарства и защитный ответ клетки на стресс: II. Молекулярные сигналы и хемотройчивость	71
5.1. Общие сведения о путях передачи сигналов в клетке	71
5.2. Рецепторы поверхности клетки в передаче сигнала	76
5.2.1. Внутриклеточные сиротские ядерные рецепторы PXR, CAR	79
5.2.2. Внутриклеточные сиротские ядерные рецепторы PXR, CAR и метаболизм лекарства	81
5.3. Об активировании сигнальных путей в ответе клетки на цитотоксический стресс	83
5.4. О двух основных программах клетки: выживание и смерть (апоптоз)	93
5.4.1. Молекулярные шапероны	95
5.4.2. О протеасомной деградации белков	99
Глава 6. Контроль клеточного цикла и жизнеспособность клетки при действии цитотоксических лекарств	104
Глава 7. О работе системы апоптоза, некроза и аутофагии клетки	119
Глава 8. О роли микроРНК (miRNA) в возникновении лекарственной устойчивости	127
Глава 9. Эпигенетические изменения информационных молекул и хемотройчивость клетки	143
9.1. О пространственных факторах эпигенетических эффектов	144
9.2. О химической модификации оснований ДНК и гистонов как факторе эпигенетических эффектов	148
9.3. О передаче эпигенетических признаков в поколениях	153
9.4. О методах изучения состояния метилирования оснований ДНК	156
9.5. Хемотройчивость связана с эпигенетическими изменениями большого числа генов	160
Глава 10. Современные возможности нанобиотехнологии в решении проблем хемотройчивости	168
10.1. Краткая характеристика современных наночастиц	170
10.2. О способах адресной доставки в организме наночастиц	173
10.3. О визуализации внутренних структур клетки с помощью наночастиц	179
Глава 11. О системной биологии и эффективности действия лекарств	188
Глава 12. Об индукции с помощью мутагена устойчивости к летальному действию мишенного ингибитора клетки кишечной палочки	205
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	225
SUMMARY	233
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	234

ВВЕДЕНИЕ

«Все возвращается на круги своя». Это осознанное и сформулированное древними правило выполняется в жизни в самых разнообразных случаях, включая и современную грозную ситуацию, например с туберкулезом [1—4] (а также в случае особенно стафилококковой и возвращающихся кишечных бактериальных инфекций, эффективность борьбы с которыми в последнее время падает). История человечества изобилует примерами пандемических опустошений, после которых, однако, оказывалось возможным восстановление численности его популяций естественным образом. Более того, злокачественная клетка становится нечувствительной к различным ударам по ней извне. Почему? Если жизнь создавалась по законам, использующим принцип обеспечения запаса ее прочности и ее глобальной неуничтожимости, то клетка должна быть наделена специальными средствами защиты от неблагоприятных воздействий, способными включаться и выключаться в соответствующих условиях. Если это так, то исчезающие виды современной экосистемы и историческая судьба динозавров ставят вопросы о причинах, нарушающих эти законы, а также о возможности управления ними. К чему и из-за чего не были готовы динозавры? Может ли такая же участь постичь самые разные виды экосистемы, например в случае возникновения таких потенциально пандемических начал, как вирусы H1, N1, SARS [19—22]? Ясно, что человеческой мысли предстоит ответить на этот вопрос для того, чтобы найти способы, снижающие цену восстановлений эпидемических опустошений, чтобы обезопасить существование вида и понять направление движения жизни во времени.

Если в основе организации биологических систем и биологической эволюции должны лежать законы совершенства бытия и безграничной приспособляемости к изменяющимся условиям существования, то решение проблемы возникновения хемоустойчивости клеток предоставляет возможность изучения самой логики живого. Каковы же эти противоударные средства защиты клетки, прежде всего на молекулярном уровне?

Биологию как науку, изучающую механизмы и субстраты процессов жизнедеятельности, можно ограничить такими предельными рамками: с одной стороны, возникновение на нашей планете жизни, а с другой — попытки ее уничтожения. На пути развития науки от древних греков до второй научной революции XX в. и далее проблема возникновения жизни занимает умы ученых, то как бы угасая в тисках идейных и технических ограничений, то разгораясь вновь под влиянием новых фактов. Такой разгар интереса к этой проблеме случился и в эру возникновения молекулярной биологии, направившей мысли в сторону обязательного предшествования факту возникновения жизни длительной эволюции малых химических молекул [5], которая привела к возникновению гена, без чего жизнь невозможна. В новейшее время эти мысли воплощаются в экспериментальные результаты. Оказалось, что в процессе становления гена молекула РНК предназначена не только, как считалось, для передачи информации в виде каких-то отдельных единиц с ДНК-матрицы на клеточный аппарат считывания информации. Согласно новым исследованиям [6], подавляющее количество образующейся в клетке РНК не связано с кодированием белков, а каким-то образом выполняет лишь регуляторную роль, определяющую функциональную активность того или иного гена. Исследования в этой области способны, по-видимому, со временем даже изменить само определение гена [6]. Это важно при поиске механизмов защиты клетки от внешних ударов. Наряду с классическими вездесущими белковыми ферментами, ответственными за метаболизм клетки, РНК способна осуществлять и каталитические функции, являясь, по существу, рибозимом [7]. Целый ряд фундаментальных процессов в клетке находится под контролем рибозимов, включая сплайсинг матриц для синтеза белков, образование пептидной связи в белковых молекулах с участием РНК большой субъединицы рибосомы, созревание тРНК в клетках любого вида (рибозим RNase P), регуляцию активности генов с использованием принципа работы *riboswitch* — рибопереклювателя [7—11]. (Последний состоит в том, что специальным образом устроенная часть мРНК — аптамер — обуславливает уничтожение данной матрицы. Следовательно, происходит отмена функции того или иного гена за счет способности узнавания аптамером определенных веществ, при связывании с которыми заключенный в этой молекуле рибозим активируется и разрушает матрицу [9, 11]. Таким образом, концентрация метаболита в клетке является фактором регуляции генной активности с помощью рибопереклювателя.)

РНК, обладающая как информационными, так и каталитическими свойствами, привлекла большое внимание в качестве наиболее вероятного претендента на роль стартового материала жизни, поскольку рибозимы могли выступать как непосредственные участники примитивного метаболизма и первоначальные формы жизни древнего мира [12, 13]. Этому посвящена специальная монография «Мир РНК» [14]. Под пристальным вниманием находятся исследования роли недавно обнаруженного особого класса низкомолекулярных РНК, miRNA, как вездесущих регуляторов геной активности [15].

Возможность получения *in vitro* каталитических молекул РНК [7–11] (и ДНК [16]) открывает путь экспериментального изучения биологической эволюции, используя принцип от «простого к сложному». Это позволяет раскрыть и изучить фундаментальные законы биологической организации живых систем (возникла даже специальная ветвь биологии — биология систем — *systems biology* [17]. Предстоит установить, что же отвечает за организационное усложнение видов, их приспособляемость к среде обитания, выживание при испытаниях на прочность, их многообразие и возможность взаимодействий при тех или иных условиях, сложившихся в клетке при различных воздействиях, а также в целом стабильность экосистемы, насчитывающей в настоящее время порядка 10^7 видов [18].

Известный английский физик-кристаллограф Джон Бернал написал уникальную книгу «Наука в истории общества» («Science in History») [23], суммирующую вплоть до второй половины прошлого века все блага человека, приобретенные благодаря развитию науки. В книге освещен путь возникновения и достижения специальных биологических дисциплин, таких, как биохимия и микробиология. Большим прорывом в деле прекращения массового истребления в эпидемиях явились методы идентификации и изучения биологии возбудителей эпидемий. Первоначально был открыт мир бактериальных патогенов, что позволило, с одной стороны, разрабатывать средства контроля над ними, а с другой — использовать их в качестве биооружия и агентов биотерроризма [24]. Другой прорыв связан не только с возможностью иммунологической защиты видов от возбудителей эпидемий, но и с вступлением человечества в новую эру — эру антибиотиков. С момента своего открытия примерно в середине прошлого века эти антимикробные средства выступили в качестве чудо-лекарств. Однако по мере их применения остро встала проблема неэффективности их действия в связи с возникновением устойчивых форм патогенов. Кратко сложившуюся ситуацию

отражает само название специально написанной книги — «Антибиотиковый парадокс: как чудо-лекарства уничтожают само чудо» [25]. Приток инвесторов к разработкам новых антибиотиков иссяк и с 1970 г. финансирование этой области резко сокращено [26].

В поисках выхода из создавшейся ситуации в биологии возникло два направления исследований. Одно из них касается механизма действия этих агентов на уровне отдельных компонентов клетки, на молекулярном уровне, что сформировало особый мишенноцентрический подход к созданию новых цитотоксических лекарственных средств. В настоящее время в этом качестве могут выступать как малые химические молекулы (создаются целые библиотеки химических соединений), так и специфически действующие макромолекулярные средства в виде пептидов и белков, представленных ферментами и антителами внутриклеточного действия — интраклеточными (*intrabodies*) [27]. Проблемы с применением макромолекулярного лекарства связаны со способами его доставки и индукцией иммунного ответа организма. Особая проблема малых химических молекул — хемоустойчивость.

Ясно, что один из путей решения проблемы устойчивости к низкомолекулярным лигандам-ингибиторам макромолекул связан с возможностью дорогостоящего расширения арсенала химиотерапевтических средств. Однако и на этом пути также существует серьезная проблема — возникновение множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), т.е. устойчивости одновременно к целому ряду химиотерапевтических лекарств. Ясно, что при таком виде устойчивости использование все новых медикаментозных средств оставляет немного надежд на удачу и по сравнению с одинарной устойчивостью может оказаться малоэффективным мероприятием.

Другое направление — изучение возможности изменений по каким-то правилам генетического статуса атакуемых форм жизни как на уровне возбудителя и хозяина, так и применительно к злокачественной клетке. Это направление находится еще в зачаточной стадии.

Так почему же первоначально чувствительная к действию цитотоксического агента клетка становится устойчивой? Какими средствами снабжена клетка в процессе ее формирования на эволюционном пути для отражения внешних ударов и стрессов? Проблема возникновения хемоустойчивости привлекает внимание в связи с поиском ответа на этот вопрос.

Большим прорывом в изучении этой проблемы стало установление роли генетического уровня организации клетки или того, что

устойчивый фенотип обуславливается какими-то изменениями в каких-то генах. Ясно, что предстояло идентифицировать такие гены и их функции, а также изучить характер соответствующих изменений в них. Достижением этого пути исследований стало раскрытие механизмов транспорта веществ на уровне клетки, работы систем глобального ответа, отвечающих за адаптацию клеток к целому ряду стрессовых условий, и механизмов, аннулирующих работу программы естественной смерти клетки — апоптоза. В случае антибактериальных лекарств фактором устойчивости выступает также явление, получившее название биопленок (*biofilm*) [28]. Это такой рост бактерий, при котором клетка, способная к абсолютно свободному существованию, не пользуется этой свободой, а объединяется с себе подобными в единосвязанное миллиардное сообщество, образуя пленку. Удивительным ее свойством является антибиотикоустойчивость. Причины образования биопленок и их устойчивости к токсикантам интенсивно изучаются [28].

Привлекают внимание данные по изучению такого явления, как белковый сплайсинг [29], при котором внутренние части молекул белков, называемые интронами, вырезаются. Судьба их в клетке остается неизвестной. Вместе с тем имеются сообщения, что в устойчивых клетках прокариот появляются какие-то неизвестные белки [30] и возможность их связи с интронами представляет интерес. В данной книге рассматриваются результаты таких исследований.

Второй прорыв в изучении механизмов хеморезистентности связан с установлением возможности обмена генетическим материалом между различными клетками за счет плазмидной и хромосомной передачи от клетки к клетке. Если какая-либо клетка содержит гены, ответственные за разрушение или модификацию того или иного химического вещества, т. е. его детоксикацию, то эти гены в составе плазмид, вирусов или мобильных элементов (транспозонов, интегронов) могут быть привнесены в чувствительную клетку, и она станет устойчивой. Таким образом, за возникновение хемоустойчивости отвечают два генетических принципа: 1) изменение в собственных генах за счет как действия окружающей среды, так и возможности геномных перестроек и 2) привнесение в клетку «генов устойчивости» извне.

Установление этого факта и развитие методов молекулярной биологии, позволяющих манипулировать с ДНК, привело в современной медицине к возникновению термина «тераностика» [31], отражающего возможность супербыстрого определения на уровне молекул ДНК статуса генов, ответственных за устойчивость. Ясно,

что тераностика дает возможность осуществлять более точные и эффективные терапевтические назначения. Более того, обнаружение привнесенных генов детоксикации и инактивации лекарств позволяет преодолеть возникающий фенотип устойчивости за счет возможности умолкания таких генов. Оно может осуществляться либо на уровне ингибирования продуктов этих генов, либо при мутационных изменениях их промоторов, либо при активации соответствующих рибозимов, либо с помощью технологии умолкания гена на основе интерференционной РНК, RNAi [32, 33], или miRNA [15].

Оказалось, что адаптивные реакции клетки с привлечением активности специальных регулонов глобального ответа клетки развиваются довольно медленно, и требуются высокие концентрации агентов, воздействующих на клетку. Однако изучение ответа клетки даже на минимальные стрессовые воздействия независимо от природы стрессора показало моментальную индукцию путей проведения молекулярных сигналов, информирующих клетку о стрессе, факторами сенсорики которого могут выступать повреждения макромолекул и редокс-потенциал клетки [34]. В книге суммируются результаты поведения регуляторов протеасомной активности по деградации функционирующих белков клетки, регуляторов клеточного цикла, а также регуляторов запрограммированной смерти клеток — апоптоза в условиях действия лекарства.

При изучении хеморезистентности также установлено, что фенотип устойчивости может возникать независимо от изменений в самой последовательности гена, а лишь от такого эпигенетического фактора, как уровень метилирования основания ДНК, а также от такого эпигенетического фактора, как степень заполненности клетки белковой массой.

Становление нанотехнологий и развитие биологии и медицины с применением этих технологий открывают новые возможности в разработке и применении лекарств, способных противостоять природной молекулярной обороне клетки. В книге суммированы результаты в этой области исследований.

В настоящее время в биологии наметился переход в характере мышления от доминировавшей идеологии редукционизма, или разделения целого на части и изучения частей по отдельности к идеологии изучения систем. Нарастает интерес к целостной неделимой структуре, или системе, проявляющей за счет уникальных взаимодействий ту или иную сущность, или «*emergent property*» («возникающее свойство»). Ясно, что такое свойство не всегда де-

терминировано генетически, но возникает благодаря уникальности возможных взаимодействий в клетке. Становление системной биологии поднимает вопрос об изучении действия лекарства и возможности нарушения или сохранения системного уровня функционирования клетки. Полученным результатам этой области исследований посвящена специальная глава книги.

Проблема хемоустойчивости интенсивно изучается на протяжении длительного периода времени, поэтому накопленные результаты широко представлены в литературе, в основном англоязычной. Настоящая книга преследует цель сосредоточить в одной работе описание всесторонних аспектов этой проблемы, включая самые последние идеи и результаты.

Автор также преследует цель привлечь внимание к гипотезе, вытекающей из его экспериментальных работ [35]. Хемоустойчивость к мишенным ингибиторам как ксенобиотикам легко возникает в клетках прокариот за счет мутаций в генах, выполняющих, очевидно, самые различные функции. Эти мутации могут быть фактором изменения плотности упаковки белков в клетке, изменения геометрического рисунка внутриклеточного пространства и характера экспонирования в него различных химических групп. Это отразится на передвижении не имеющего специальных систем доставки вещества в клетку и приведет к транспортному затору. В результате лекарство не сможет достичь своей мишени. Такое явление называется секвестрацией лекарства-лиганда и мишени [35].

Поскольку такой вид хемоустойчивости у прокариот возникает наиболее часто, необходимо найти пути преодоления физической секвестрации вещества в клетке. Обсуждается возможность решения этой проблемы за счет использования способности различных наноструктур (углеродных нанотрубок и др.) проникать в клетку и в качестве нанопутей (или стентов) разглаживать такие заторы [35]. Так почему же в донаучные времена люди интуитивно лечились порошком малахита [36], может быть, как отличным наноматериалом, преодолевающим секвестрацию? Не является ли это еще одним подтверждением того, что действительно «все возвращается на круги своя»?

* * *

Выражаю глубокую благодарность академику НАН Украины, директору Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины Анне Валентиновне Ельской за первопрочтение данной книги и ценные замечания, а также члену-корреспонденту НАН Украины Дмитрию Николаевичу Говоруну за поддержку и вдохновение.

КАК ИЗУЧЕНИЕ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ХЕМОУСТОЙЧИВОСТИ ВЫШЛО НА УРОВЕНЬ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТКИ

На заре развития молекулярной генетики, примерно в середине прошлого века, было известно, что при действии вируса на огромное число клеток бактериальной популяции всегда выявляется определенное количество клеток, устойчивых к его действию. Естественно, возник вопрос, появляются ли эти клетки в результате самого действия вируса или они предсуществовали в популяции, и вирусная инфекция является лишь фактором селекции таких клеток. А если такие клетки предсуществуют и способны передавать признак вирусоустойчивости по наследству последующим поколениям, то это означает, что они (по сравнению с чувствительными клетками дикого типа) несут определенную генетическую мутацию, которая и сообщает фенотип устойчивости к вирусной инфекции. Как различить эти две возможности? На этот вопрос позволяют ответить результаты так называемого флуктуационного теста Лурии—Дельбрюка [1]. Если многочисленную популяцию бактерий разделить на великое множество аликвот, содержащих равное и очень малое число клеток, затем дать им время размножиться до значительной величины и определить, сколько устойчивых к данному вирусу клеток выявляется в каждой такой аликвоте, то результатом окажется поразительный разброс данных, огромные флуктуации. Ясно, что такой результат может получиться только в том случае, если в какое-то небольшое число клеток данной аликвоты попали клетки, несущие предсуществующую мутацию, ответственную за фенотип устойчивости. Поскольку в данной аликвоте число устойчивых клеток будет возрастать в ряду поколений, увеличиваясь в два раза с каждым новым делением, то конечное количество таких клеток будет огромным. В аликвотах, в которые предсуществующие мутантные клетки не попали и в которых может наблюдаться лишь редкое событие спонтанного мутагенеза, это количество большим не будет. Таким образом, с помощью флуктуационного теста впервые было убедительно показано, что возникновение устойчивости к внешнему воздействию может быть

связано с появлением каких-то мутаций в каких-то генах. Так возникла генетическая парадигма исследований проблемы устойчивости клетки к внешним воздействиям, включая проблему хемоустойчивости.

Более того, установление факта, что клетки бактерий могут обмениваться генетическим материалом за счет возможности передачи как хромосомного, так и плазмидного материалов при клеточных контактах, а также при вирусных инфекциях, открыло новую страницу в изучении проблемы лекарственной устойчивости. Так, при эпидемии кишечной инфекции в Японии примерно в середине прошлого века было обнаружено, что в устойчивом к антибиотикам возбудителе — палочке шигелл в отличие от чувствительной формы появляется новый генетический элемент, автономный от хромосомного аппарата. Этот элемент, представленный соответствующей плазмидой, содержит набор генов, продукты которых узнают антибиотики как субстраты, подвергая их химическим изменениям, что полностью инактивирует лекарство. Эти гены получили специальное название *R*-детерминант (от *resistance* — устойчивость) [2]. Уже в первых опытах было установлено, что бесклеточные экстракты устойчивого возбудителя обладают способностью не только полностью разлагать лекарство, но и подвергать его химическим модификациям — фосфорилированию, ацелированию, уничтожающим действенное начало медикамента. Ясно, что для преодоления хемоустойчивости, обусловленной *R*-детерминантами, необходима разработка средств контроля над ними либо на уровне генов, либо на уровне их продуктов. Подробнее об *R*-детерминантах можно прочитать в монографиях [2, 3].

Итак, возникновение хемоустойчивости связано как с трансмиссивными генами, привносимыми в клетку извне, так и с изменением статуса каких-то генов хромосомного аппарата. Что представляют собой хромосомные гены, ответственные за хемоустойчивость и как их изучать? Если хемоустойчивость — результат мутационного процесса, то какую картину в отношении устойчивости к действию того или иного лиганда-ингибитора можно получить под влиянием действия на клетку мутагенного фактора?

Какие же гены, затрагиваемые мутациями, отвечают за возникновение хеморезистентности? Ответ на этот вопрос позволяет дать изучение тех генетических и биохимических процессов, в которые вовлекается лекарство при контакте с клеткой. Рассмотрению этих процессов посвящена следующая глава.

О ГЕНЕТИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ КЛЕТКИ, НИВЕЛИРУЮЩИХ ДЕЙСТВИЕ МИШЕННЫХ ЛЕКАРСТВ

Если мишенное лекарство как лиганд обладает способностью связывания только со специфической молекулярной структурой клетки, являясь, по сути, метаболическим ингибитором, то для проявления конечного результата цитотоксического действия применяемой химиотерапии необходимо выполнение ряда условий. Эти условия определяются успешным прохождением той серии процессов, в которое вовлекается лекарство, прибавленное к клеткам и которые предшествуют акту связывания лиганда с сайтом мишени. Прежде всего, лекарство должно проникнуть в клетку и не должно быть из нее выведено с помощью специальных клеточных средств. Далее, необходимо сохранение в клетке места размещения и интактности химической структуры лекарства, не подверженного действию ферментов детоксикации, приводящих к химическому разложению или модификации. Успешное выполнение этих условий поднимает следующий вопрос либо о возможности свободного распределения лекарства внутри клетки и свободном доступе лекарства к мишени, либо о возможности существования клеточных структур и их переорганизаций, которые ведут к секвестрации лиганда и мишени. При отсутствии ситуации секвестрации лекарство может войти в контакт с мишенью. Однако при этом очень важно выполнение еще двух правил. Первое — это соответствие между концентрацией лекарства, которое может войти в клетку, и концентрацией мишени, ее сайта связывания лиганда. Последнее определяется уровнем экспрессии гена, которое может зависеть либо от статуса промотора гена мишени и изменений в характере регуляции активности гена-мишени, либо от возможности амплификации, т. е. увеличения числа копий этого гена в геноме. Второе правило определяется присущим клеткам процессом мутационных изменений генетической информации клетки. Если мутация изменяет сайт связывания мишенного лекарства или какой-либо другой участок данной мишени, способный дистанционно влиять

на конформацию сайта связывания лекарства мишенью, то это приведет к фенотипу устойчивости к данному лекарству и неэффективности его действия. Ясно, что мутации в связывании сайта лиганда не должны быть критическими для каталитической функции мишени.

Если мишенное лекарство как лиганд все же в конце концов связалось с мишенью, означает ли это полное достижение поставленной цели? Не всегда. Оказывается, что в борьбе за жизнь при выведении из строя важной метаболической мишени клетка может реализовать еще и такие две возможности. Первая — пойти по пути биохимического обхода инактивированной мишени (*metabolic bypass*). Вторая — пойти по пути структурной мимикрии сайта связывания данного лиганда не мишенной, а какой-нибудь менее важной для жизнедеятельности клетки молекулой.

При изучении хемоустойчивости были сделаны и такие наблюдения, которые показали, что при действии антибиотика на клетку какие-то клеточные белки, экранируя ту или иную белковую молекулу, начинают защищать мишень от действия антибиотика, что может быть названо белково-белковой защитой мишени.

Более того, оказалось, что свободноживущая микробная клетка, чувствительная к действию того или иного антибиотика, способна объединяться с себе подобными клетками, образуя единое многомиллиардное сообщество, называемое биопленкой [1]. В условиях биопленки исходно чувствительные клетки становятся хемоустойчивыми. Почему?

Итак, вероятность функционирования клетки в условиях среды обитания, отличающихся от оптимальных, позволяет установить, что клетка снабжена специальными молекулярными механизмами, защищающими ее гомеостаз. Эти механизмы по характеру действия и влиянию на тот или иной процесс в клетке можно сгруппировать соответствующим образом в специальные группы. Охарактеризуем эти группы.

2.1. О ТРАНСПОРТЕ ВЕЩЕСТВА В КЛЕТКУ И ИЗ КЛЕТКИ

Немного об истории вопроса. Начальные этапы изучения транспортной функции клетки были связаны с характеристикой таких процессов, как адсорбция, диффузия, облегченная диффузия (которая характеризуется насыщением и требует наличия пассивных специальных переносчиков) и активный транспорт, осуществляе-

мый против градиента концентраций специальными транспортными системами. Первоначально основные силы сосредоточивались на изучении транспорта в клетки ионов водорода, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} . Оказалось, что за транспорт этих ионов ответственны специальные АТФазы. Их стали называть насосами. Отметим, что транспортные белки, использующие АТФ, считаются первичными транспортными средствами, а те, которые не используют АТФ, — вторичными. Последние делятся на такие, которые переносят только один субстрат (*uniport*), два субстрата в одном направлении (*symport*) и два субстрата в разных направлениях (*antiport*).

Когда бактериальная клетка стала центром тяжести генетических исследований, транспортные исследования чрезвычайно расширились. В случае грамнегативной бактериальной клетки транспортируемому веществу необходимо преодолеть три микродерматологических барьера: 1) наружную, или внешнюю мембрану, состоящую из липополисахаридов, фосфолипидов и белков; 2) клеточную стенку, представленную сетчатым пептидогликановым слоем; 3) цитоплазматическую мембрану (состоящую из фосфолипидов и белков). Опыты по реконструкции *in vitro* протеолипосом на основе компонентов внешней мембраны показали легкое проникновение маркерного вещества при условии включения в структуру протеолипосомы молекул белка только одного вида. Этот белок получил название порина. Оказалось, что он образует заполненный водой канал, по которому транспортируется данное вещество. В настоящее время изучены разные белки, образующие как субстрат-неспецифичные, так и субстрат-специфичные каналы (многие из них регулируются и могут открываться и закрываться в зависимости от физиологических условий) [2]. Интересен подсчет, который показал, что одну клетку кишечной палочки пронизывает приблизительно 10^5 таких каналов [3].

Итак, изучение поведения протеолипосом, получаемых мембранных везикул, результатов замораживания и скалывания мембран, действия на их свойства различных модифицирующих реагентов, а также результатов обработки мембранных препаратов с помощью детергентов и осмотического шока показало, что транспортные белки (составляющие три группы — насосы, переносчики и каналы) являются мембранными белками. Считается, что эта группа составляет до 30 % и даже более всех клеточных белков [4]. Как эти белки доставляются в мембрану, как ук-

ладываются и как функционируют? Данные по изучению топологии и топографии мембранных белков содержатся в обзоре [5].

Прежде всего, основная характеристика мембранного белка — наличие специального гидрофобного участка, позволяющего белку пересекать мембрану. Участок получил название трансмембранного сегмента, или домена (TM, TMS, TMD). По числу таких сегментов мембранные белки делятся на моно-, би- и политопные. Также по числу этих сегментов мембранные белки объединяются в семейства, что облегчает изучение логики устройства клетки. Отметим, что большую роль в изучении топологии мембранных белков сыграл такой разработанный генетический подход. Если какая-либо ферментативная активность обнаруживается только в периплазме клетки *E. coli* (компаратмент между внешней и цитоплазматической мембранами), но не в цитоплазме, потому что только здесь работает специальный механизм соответствующей укладки белка (dsb A—dsb D — *disulfide bond formation*), то это означает следующее. Данный белок, снабженный всеми необходимыми сигнальными элементами, благополучно прошел сквозь цитоплазматическую мембрану от места своего синтеза в периплазму. Если лишить такой белок с помощью генно-инженерных методов собственных сигнальных последовательностей и заменить их соответствующими последовательностями изучаемых интегральных мембранных белков, то таким образом можно изучить «кто есть кто» в этих молекулах, трудноизучаемых по функциональной активности [6]. Этот метод интенсивно используется при изучении интегральных мембранных белков, особо прочно связанных с мембраной. Такими белками является большинство транспортных белков, хотя обнаружены и такие, которые легко солюбилизируются при осмотическом шоке и детергентной обработке и, следовательно, прочно связаны с мембраной.

Обнаружение в составе *lac*-оперона гена, ответственного за транспорт лактозы в клетки *E. coli*, расширило и углубило изучение процессов транспорта вещества в клетки. Этим белком оказался интегральный мембранный белок, относящийся к классу вторичных переносчиков. Белок использует электрохимический потенциал мембраны, создаваемый различием в концентрации протонов с обеих сторон мембраны так, что становится возможным физическое перемещение молекул (моторная способность потенциала, или pmf — *proton motive force*) и осуществляется симпорт H^+ /лактоза. Возможность использования мутан-

тов при изучении транспорта лактозы стимулировала получение и изучение мутантов с измененными характеристиками транспорта других веществ. Особой интенсивности достигли исследования поступлений в клетку прокариот гистидина и мальтозы (см. обзор [7]). Был предложен термин «пермеазы» для белков, ответственных за поступление в клетки веществ.

В области изучения клеточных процессов, осуществляющих транспорт веществ, следует отметить три момента. Первый касается установления факта выброса веществ из клетки наружу (на примере дауномицина из клеток асцита Эрлиха). Это было обнаружено датским биохимиком Keld Dano в 1973 г. (*Biochim. et biophys. acta.* — 323:466—483). Статья оказалась настолько важной при изучении механизма множественной лекарственной устойчивости, что Igor Roninson (один из лидеров в этой области) дал ей второе рождение и полностью перепечатал ее в престижном *J.NIH Res.* — 1994. — 6:66—74 для того, чтобы все знали, какое «слово» было вначале. Во-вторых, работающий как корабельная помпа белок Pgp оказался удивительно устроенным. Его структура характеризуется, прежде всего, парностью доменов так, как если бы этот белок образовался в процессе эволюции за счет дубликации единого предкового гена. Pgp-белок представлен трансмембранной частью (6 сегментов, пересекающих мембрану) и цитоплазматической частью, представленной нуклеотидсвязывающим доменом (NBD — *nucleotide binding domain*), связывающим АТФ. Поскольку такая структура повторяется 2 раза, и в одной молекуле АТФазы выявляется сразу 2 NBD, такие ферменты были названы ABC-АТФазы (от АТР-binding cassette). Было также предложено название — транспортные АТФазы. Отличительной чертой этих ферментов оказалась их способность узнавать не один, а множество субстратов. Во избежание энзимологических терминологических накладок был предложен термин «аллокриты» для множества субстратов, узнаваемых такими белками [8].

Вторым моментом при изучении транспортных функций в клетке оказалось то, что бактериальные белки, отвечающие за поступление в клетки гистидина и мальтозы, удивительно повторяли структуру Pgp млекопитающих [7]. Основное различие между этими молекулами состояло в том, что TMD- и ABC-домены у бактерий представлены отдельными субъединицами, а не единым полипептидом, как в случае Pgp. Оказалось, что единообразно устроенная структура молекулы транспортного белка

АВС-типа характеризуется транспортной векторностью, или способностью направлять движение субстратов, представленных малыми молекулами, как наружу, так и внутрь клетки. Это обеспечивается тем, что различные части молекулы переносчика, связавшие и не связавшие АТФ, могут по-разному взаимодействовать друг с другом. Образованная различиями в конформации трансмембранных сегментов камера способна изменять ориентацию сайта связывания ксенобиотика и быть открытой со стороны либо внешней мембраны клетки, либо цитоплазматической мембраны [9].

Третий момент, расширивший изучение молекулярных транспортных средств отдельной клетки, — это клонирование Tet В-белка, выбрасывающего тетрациклин из клетки при экспрессии гена этого белка в составе мультикопийной плазмиды. По структуре этот белок совершенно не напоминал Pgp-белок и относился к классу переносчиков, называемых MFS — *major facilitator superfamily*. Функциональная активность этих белков зависит от электрохимического потенциала мембраны и pmf и подавляется с помощью ионофоров, селективно выравнивающих градиент протонов, определяющих мембранный потенциал клетки. Неожиданным стал результат обнаружения первого белка Qac A из группы MFS, который оказался множественным экспортером, обеспечивающим МЛУ к ряду антимикробных средств. Этот результат положил начало изучению множества pmf-зависимых МЛУ-экспортеров клетки [11], а также пермеаз MFS-типа, ответственных за вход вещества в клетку [12, 13]. В последнее время наблюдается прорыв в изучении пермеаз, которые получили специальное название — носителей растворимых веществ — *solute carriers* — SLC, представленных семействами с большим числом членов различных белков, ответственных за вхождение в клетку многочисленных веществ [14].

В настоящее время основные усилия по изучению лекарственной устойчивости, особенно МЛУ, сосредоточены на возможности экспорта лекарств из клеток. Известные множественные экспортеры делятся на две группы, функционирующие в зависимости от АТФ и электрохимического потенциала, и составляют 4 суперсемейства известных переносчиков: 1) АВС-переносчики; 2) MFS-переносчики; 3) RND-переносчики; 4) SMR-переносчики. Первая группа переносчиков использует для своей активности энергию АТФ, остальные группы транспортных белков функционируют на основе pmf. Кратко охарактеризуем эти группы транспортных белков.

2.1.1. АТФ-зависимые множественные АВС-экспортеры

Изучение этой группы переносчиков имеет более чем 30-летнюю историю. Информация об этих белках представлена в обзоре [9]. Здесь укажем следующее. АВС-АТФазы ответственны за транспорт и внутрь, и наружу клетки огромного количества соединений, представляющих как питание, так и ксенобиотики, как гидрофильные, так и гидрофобные, как малые, так и большие молекулы (например, белковые токсины). То, что для этой группы белков характерна довольно высокая степень гомологии (до 30 % [14]) указывает на экономное расходование в природе биологических ресурсов. Благодаря гомологии и наличию консервативных специальных мотивов белковых и соответственно их нуклеотидных последовательностей, служащих «личной подписью» (*signature*) этих белков, переносчики указанного типа могут быть узнаны у любых организмов на основании сиквенса их геномов, хотя и не всегда выявление специального мотива служит доказательством транспортной функции молекулы [9].

Другим средством достижения разнообразия в узнавании транспортируемых веществ является возможность комбинаций АТФ-связывающих АВС-доменов с различными трансмембранными доменами. При едином плане строения этих переносчиков возможны структурные вариации: это либо разные домены одной и той же полипептидной цепи, как в случае клеток эукариот, либо разные субъединицы, кодируемые разными генами. Это наблюдается в случае прокариот [7]. При реализации принципа парности структур, связывающих АТФ, эти субъединицы могут быть как гомологичными, так и гетерологичными. Выявляются разные структуры в виде добавок (дополнительные трансмембранные сегменты, дополнительный домен, регулирующий активность канала, представленного таким АВС-белком, как проводящий в клетку ионы хлора и тиоцианаты *cystic fibrosis transmembrane regulator* — CFTR, инактивация которого приводит к муковисцидозу). Более того, оказалось, что обнаруженный у молочнокислых бактерий белок Lmg A, являющийся экспортером АВС-типа, не подчиняется принципу парности, т. е. представлен лишь половиной молекулы белка Pgp. Несмотря на это, Lmg A функционирует как полноценный экспортер даже в клетках эукариот, узнающий тот же спектр аллокритов, который характерен для Pgp-белка [84].

Примечательно, что при едином плане строения АВС-переносчики могут осуществлять как импорт, так и экспорт веществ. При

этом важны детали устройства переносчиков. У импортеров, как правило, используется еще специальный связывающий белок, который доставляет вещество к переносчику.

Осуществляется поиск и определенных сигнальных последовательностей, важных для функционирования переносчика. Считается, что за узнавание транспортируемого вещества ответственны трансмембранные сегменты молекулы переносчика (рис. 2.1, см. вклейку). Акт такого узнавания приводит к конформационным изменениям, в результате которых активируются АВС-домены. Однако при узнавании аллокрита сайт его связывания в переносчике, прежде всего, претерпевает соответствующие изменения в результате только связывания, но не гидролиза АТФ [15]. Для активности переносчика важны наличие и функциональная целостность обоих АВС-сайтов, которые, однако, гидролизуют АТФ не параллельно, а последовательно. При этом была выявлена различная доступность сайтов этих доменов к тиоловым реагентам. Следовательно, не существует абсолютной тождественности этих доменов. Особое внимание уделяется симметричным остаткам глицина 534 и 1179, глутамину 471 и 1114, а также консервативным 6 парам аспаргатов и глутаматов [16–18].

Изучение различных мутантных форм Pgp вызвало интерес к вопросу есть ли связь между полиморфизмом гена этого переносчика и результатами фармакотерапии? Необходимая информация предоставлена в работе [19]. В гене белка Pgp обнаружено 15 SNP (*single nucleotide polymorphism*). Большинство из них для функции неважны. Однако при замене в гене аллели С₃₄₃₅→Т в клетках кишечника выявляется пониженная концентрация белка Pgp, что должно ослаблять выброс лекарства из клетки и при этом наблюдалось более эффективное действие применяемого лекарства. В случае же в этом месте аллели «С» — все наоборот. (Интересно отметить, что у 25 % жителей Кавказа количество сердечного препарата дигоксина в плазме крови пациентов этого региона повышено по сравнению с пациентами других ареалов так, как будто выброс лекарства из клеток происходит интенсивнее, и у них также часто встречается аллель «Т».) Вопрос о связи полиморфизма в гене АВС-переносчика с его активностью в организме представляет интерес и требует дальнейшего изучения.

Ясно, что важна проблема регуляции активности множественного экспортера. Решение ее с помощью классических химических ингибиторов чревато нарушением нормального функционирования организма. Привлекает внимание возможность направленного воз-

действия в организме лишь на активность молекулы переносчика. Необходимой избирательности можно было бы добиться с помощью использования нуклеотидных последовательностей, антисмысловых в отношении текста гена данного переносчика, в результате чего этот ген не будет работать. Попытка развития такого подхода была предпринята в работе [20].

Изучение транспортных функций молекул в клетке показало, что это очень важные функции и к их исполнению привлечен специальный аппарат, представленный различными молекулами. Это демонстрируется тем, что наряду с вездесущим экспортером Pgp в клетках млекопитающих обнаружен второй экспортер — белок MRP (*multidrug resistance protein*), который похож по своему устройству на Pgp, хотя имеет дополнительные трансмембранные сегменты. Спектр аллокритов этих двух экспортеров достаточно разный и так их можно отличать. Однако главное отличие этих двух типов молекул заключается в том, что MRP-насос экспортирует аллокриты как конъюгаты с глутатионом. Интенсивно изучается такой переносчик, как BRCA 1, активность которого резко увеличивается при онкологических заболеваниях.

2.1.2. Протонзависимые множественные экспортеры

Описанию этих белков посвящены всеобъемлющие обзоры [9, 10]. Здесь отметим следующее. Клонирование и секвенирование генов, обуславливающих МЛУ у прокариот, а также компьютерный анализ секвенированных геномов выявили в клетках как прокариот, так и эукариот огромное количество не похожих на ABC-белки мембранных переносчиков (обслуживающих, как и ABC-транспортёры, импорт и экспорт многих молекул), работа которых зависит от мембранного потенциала. Началось их подробное изучение. В настоящее время особое внимание сосредоточено на множественных экспортерах как механизме МЛУ. Все они оказались антипортёрами, выбрасывающими аллокрит в обмен на протон. Интенсивное изучение показало, что бактериальные экспортеры этого типа можно разделить на три группы белков: 1) семейство MFS — *major facilitator superfamily* белков; 2) семейство SMR — *small multidrug resistance*, представленное минибелками-экспортерами, способными также обуславливать МЛУ у прокариот; 3) так называемое RND (*resistance/nodulation/division*)-семейство белков, важных в процессах узлообразования в корнях люцерны под действием ризобий, а также деления и хемоустойчивости клетки.

Основной характеристикой протонзависимых белков-экспортеров также является высокая степень гомологии на уровне нуклеотидных последовательностей и способов функционирования. При этом одни белки этого типа используют дополнительные белки, другие — нет. Кратко охарактеризуем эти группы.

Множественные экспортеры семейства MFS делятся на такие, которые содержат либо 14, либо 12 TMS. В области С-конца этих белков никогда не наблюдается гомологии, в то время как в N-конце она значительна. Считается, что за узнавание аллокрита отвечает С-конец этих переносчиков, в задачу же N-конца могло бы входить обеспечение насоса энергией. При изучении строения этих переносчиков обращает на себя внимание то, что по всей протяженности ТМ части выявляются гомологичные участки последовательностей. Это указывает на то, что такие переносчики также могли образоваться с помощью дубликации предкового гена и дополнительных приобретений в процессе эволюции. Установлен ряд специфических мотивов, характеризующих эти белки, изучается их функциональная значимость [9, 10].

Идентификация множественных экспортеров бактерий позволила обнаружить в клетках млекопитающих белки, построенные по типу 12 TMS-бактериальных переносчиков MFS-типа. Это белки VMAT 1 и VMAT 2 (*Rang H.P. Pharmacology.* — Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003). Коснемся одного из них. VMAT 1 ответствен за транспорт в участки синапсов таких нейротрансмиттеров, как моноамины (допамин, эpineфрин, серотонин). Этот транспорт определяется также электрохимическим потенциалом мембраны клетки, и переносчик работает по типу антипортера на основе протона. Оказалось, что VMAT 1 узнает также различные химиотерапевтические агенты и способен их накапливать и как бы замуровывать в специальных образованиях (*vault*), от которых клетка освобождается с помощью экзоцитоза. Таким образом, этот переносчик также является фактором МЛУ. Изучаются два новых переносчика, обнаруженные в клетках эукариот, однако аналогичные бактериальным переносчикам данного типа. Это белок OAT 1 [21] и отвечающий за гомеостаз холестерина белок NPC1, похожий по своему устройству на RND-переносчик [22]. Интересно, гомологичен ли известным бактериальным переносчикам, переносящим органические анионы, OAT-белок из почки крысы, идентифицированный в работах [23]?

SMR-переносчики чрезвычайно малы, порядка 100 аминокислотных остатков. Пересекают цитоплазматическую мембра-

ну всего лишь 4 раза. В функциональном состоянии димеризуются так, что α -спирали пересекают мембрану 8 раз антипараллельным образом по отношению к мономерам. Функционируют без помощи дополнительных белков [9].

RND-семейство включает переносчики, организацию которых отличает наличие 12 TMS и двух особо больших экстрацитоплазматических петель. Они располагаются между TMS 1 и 2, а также TMS 7 и 8. Функциональная роль этих петель связана с узнаванием веществ, экспортируемых из периплазмы наружу клетки через отверстие, представленное специальной белковой структурой TolC (рис. 2.2). Наиболее изученными переносчиками этой группы являются белки, кодируемые генами оперона *acr AB E.coli* (устойчивость к акрифлавину и другим катионным красителям) и *mex AB/opr M* псевдомонад. Последний — это мощный насос, предназначенный для выведения из клеток вторичных метаболитов. Была также показана роль этого насоса в передаче сигналов у бактерий от клетки к клетке (*quorum sensing, cell-to cell signalling*, см. [25—28]). Он оказался способным узнавать многие антимикробные средства как аллокриты и, таким образом, является фактором МЛУ. Отметим, что в работе [28] обнаружено, что при сверхэкспрессии в клетках *E. coli* гена *mdf A* наблюдается устойчивость к необыкновенно широкому спектру аллокритов, и оказалось, что от активности этого гена зависит обмен ионов $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{H}^+$ и поддержание внутриклеточного pH [9].

Помимо характерной организации нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих переносчики этого типа им присуща еще и такая черта. Оказалось, что они функционируют либо сами по себе, либо в комплексе с дополнительными белками. Пример первого — насос QacA, обнаруженный в клетках стафилококка, пример второго — насос EmrB клеток *E. coli*. EmrB, узнающий разные аллокриты, функционирует в комплексе с EmrA, который обеспечивает контакт между внешней и внутренней мембранами. Таким образом, EmrB составляет группу белков, сливающих внутреннюю и внешнюю мембраны клетки, белков MFP (*membrane fusion proteins*). При изучении *mex AB* насоса псевдомонад установлено, что он работает в комплексе с белком типа MFP, а также с белком внешней мембраны типа OMF (*outer membrane factor*), который выталкивает соединение через внешнюю мембрану. Такая информация, полученная при изучении белков прокариот, может оказаться полезной при идентификации переносчиков, работающих на уровне мембран митохондрий и других компартментов эукариотической клетки.

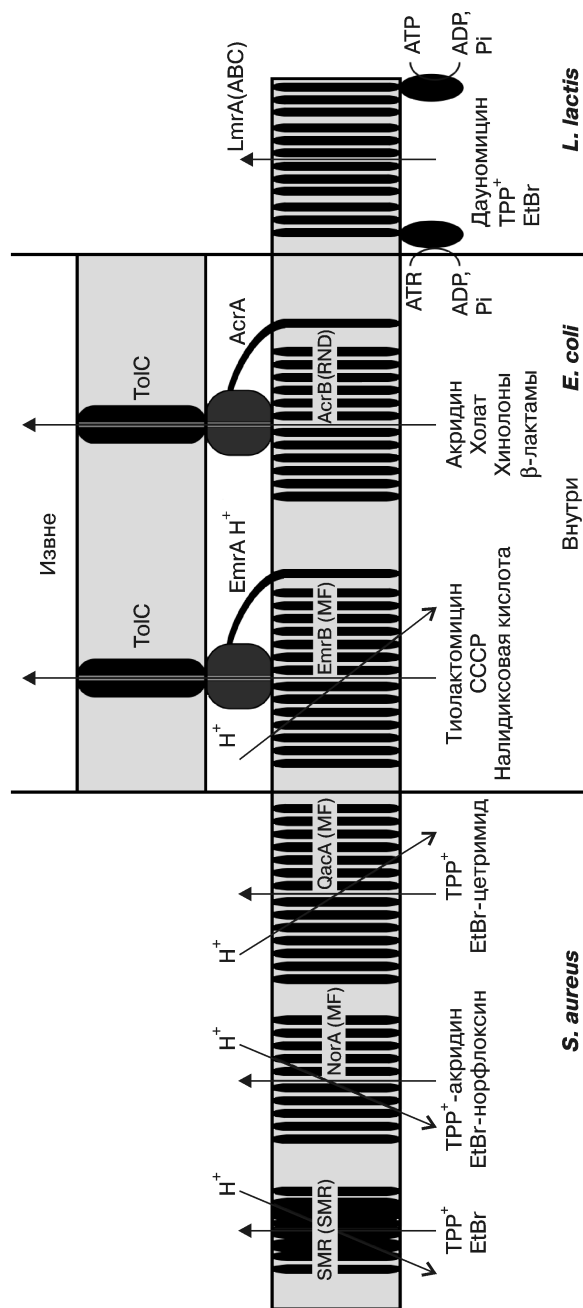


Рис. 2.2. Бактериальные насосы, перекачивающие множественные субстраты [84]

Обнаружение МЛУ, связанной с активностью белковой молекулы, узнающей и выталкивающей из клетки разные неродственные соединения, поставило вопрос о природе неспецифичности молекулярного узнавания. Оказалось, что исследования по этой проблеме легче проводить не на мембранно-связанных труднодоступных белках-переносчиках, а на специальных растворимых белках клетки, чувствующих внутриклеточное поступление ксенобиотиков. Ответ на поставленный вопрос был получен при изучении кристаллов (в комплексе с аллокритами) белка VmrR как транскрипционного активатора насоса, выводящего ксенобиотики из клетки сенной палочки. Таким образом, попадание ксенобиотика в клетку приводит к тому, что он узнается в первую очередь белком, который при связывании с ксенобиотиком становится транскрипционным активатором, увеличивающим экспрессию гена, кодирующего переносчик, клетка заполняется этим белком, и выброс ксенобиотика становится эффективным. Помимо VmrR известен также транскрипционный активатор QacR [9]. Оказалось, что при связывании аллокрита меняется укладка белка, α -спирали перераспределяются так, что образуется специальный внутренний карман, удерживающий вещество как конформационно, так и электростатически (установлена особая роль в этом связывании глутаматного остатка [9, 21]).

Итак, исследования, стимулированные поисками механизмов выявляемой цитотоксической устойчивости, позволили установить многокомпонентную систему снабжения клетки различными транспортными средствами. Естественно возникает вопрос, снабжена ли клетка такой развитой транспортной системой как средством многократной защиты от токсического воздействия окружающей среды или все эти переносчики связаны с транспортом соединений, возникающих при нормальном физиологическом функционировании клетки. Эта область остается областью интенсивных исследований.

2.1.3. SLC — переносчики, ответственные за поступление малых молекул в клетку

Развитие техники манипуляций (*expression cloning* и *expressed sequence tag* — EST) с отдельными последовательностями генома и создание их представительных библиотек на основании соответствующих многочисленных клонов дало возможность показать, что при поступлении того или иного вещества в клетку в ней инду-

цируется синтез специального белка. Этими веществами могут быть как различные природные компоненты питания, так и различные ксенобиотики. В связи с важностью функции этих белков они и получили название переносчиков растворенных веществ — *solute carriers* — SLC. В результате изучения организации клонированной генетической последовательности, кодирующей такой белок, установлено строение генов SLC-белков и выявлены функционально разные домены в молекуле такого белка. Лавинообразное нарастание информации о секвенировании самых разных геномов экосистемы показало, что этот класс белков чрезвычайно многочислен. Если переносчики ABC-типа составляют 7 семейств (ABCA — ABCG), включающих 48 членов, то SLC-переносчики представлены 43 семействами с разным числом членов в каждом из семейств так, что общее число идентифицированных в настоящее время членов составляет 319 [29]. Принципы классификации этих белков представлены в [13]: они также делятся на переносчики *uniport*, *symport* и *antiport*. Оказалось, что, например, геном человека содержит более 2000 (~5 %) только генов этого типа, которые дополняются такими *non* SLC-генами, как гены для АТФ-зависимых и протонзависимых переносчиков, каналов, ионных рецепторов. Таким образом, транспортные функции клетки как неотъемлемая черта жизни — результат работы специальной сложно организованной молекулярной машины, подогнанные друг к другу звенья которой возникали в процессе формирования жизни [9].

Открытие огромной армии транспортных белков поднимает вопрос о задействованности их в организме в норме и при патологии в различных условиях его функционирования и механизмов регуляции генной экспрессии и активности белка в тех или иных условиях. Эта проблема имеет двоякое значение. Чем активнее в той или иной ткани или органе переносчик, тем больше поступает вещества. С одной стороны, это обеспечивает адресную доставку лекарства в организме, но, с другой, в случае активности переносчика в клетках, не связанных с патологией организма, увеличивает фармакологическую токсичность. Следовательно, при использовании переносчика того или иного лекарства необходимо знать характер его экспрессии в самых различных тканях. Примером успешного использования SLC в медицинских целях является доставка лекарства в печень. Для нее, в отличие от других органов организма характерна повышенная экспрессия специального олигопептидного переносчика PEPT1

(SLC15A1). Оказалось, что если к лекарству, применяемому при заболевании Паркинсона, присоединить аминокислотные остатки, узнаваемые PEPT1 (специально дериватизированное лекарство), то концентрация такого деривата в клетках печени повышалась, и результаты лечения этой патологии резко улучшались [29].

Установлен ряд заболеваний, связанных с нарушением SLC-переносчиков [13], и изучение этих молекул привлекает большое внимание. В настоящее время исследуется обнаруженный факт возможности взаимодействий между SLC-переносчиками и белками, содержащими так называемый домен PDZ [29].

Что такое PDZ-домен? В молекулярных исследованиях развивающихся эмбрионов дрозофилы обнаружены три разных белка, образующие устойчивые комплексы между собой. Основой такого комплексообразования оказалось то, что несмотря на все различия, эти белки содержали одинаковый домен, по которому происходило как бы молекулярное склеивание этих белков за счет увеличения степени образования β -складчатых структур в данном домене, и это способно выполнять функцию молекулярного крепежа. Были идентифицированы гены этих белков, и по первым буквам названий этих генов получил название PDZ-домен. Оказалось, что этот домен, способный узнавать специфические мотивы в молекулах белков, присущ большому числу разных белков клетки, к которым относятся также многие транспортные белки клетки. Какую же роль в их работе могут играть PDZ-домены?

Для исследований было выбрано четыре белка, содержащих такие домены. Два из них содержали 4 PDZ, а два других — 2. Оказалось, что в эпителиальных клетках почек и тонкого кишечника у нормальных мышей изучаемый SLC-белок локализуется в апикальной мембране. Однако у $-/-$ мышей, нокаутированных по различным PDZ-доменам генов выбранных белков, локализация переносчика, взаимодействующего с меньшим числом PDZ-доменов белков по сравнению с нормальными мышами, также изменялась. Переносчик уходил с поверхности в глубь клетки, и это изменяло ее функциональную картину [29]. Начало таким исследованиям положено, и получение новых данных вызывает интерес. Идентифицированные транспортные средства клетки схематически показаны на рис. 2.3 (см. вклейку).

2.2. О ДЕТОКСИКАЦИИ ИНГИБИТОРОВ В КЛЕТКЕ: ГИДРОЛИЗ СОЕДИНЕНИЙ И ИХ ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ

Способность клетки обезвреживать поступающие в нее вредные химические соединения наиболее сильно проявляется в царстве прокариот, в котором в качестве питания клеток могут использоваться самые разнообразные химические соединения и в котором действуют антибиотики. Поиск ответа на вопросы, как бактериальная клетка может использовать для своего роста, например, камфору и почему этого не может делать соответствующий мутант, а также как штамм-продуцент защищает себя от производимого им антибиотика, привели к идентификации генов, способных либо разлагать, либо химически изменять те или иные соединения. Подробному описанию путей биодegradации веществ и идентификации генов детоксикации биологически активных веществ посвящен обзор [30]. Генам, кодирующим ферменты β -лактамаз, локализованных в периплазме [31], аминогликозидмодифицирующие ферменты [32], разрушающие либо изменяющие антибиотики, что делает клетки нечувствительными к их действию, посвящены многие работы (см. обзоры [33, 34]).

Отметим также успехи усилий, связанных с обнаружением в природе микроорганизмов, обладающих С—Р-лиазной активностью [35 и ссылки в этой работе]. С—Р-лиазы — это ферменты, деградирующие специальные фосфоновые соединения как встречающиеся в природе в виде фосфоновых антибиотиков, так и искусственно сконструированные человеком. Таким образом, конструирование селективных ингибиторов для соответствующих клеток связано с необходимостью проверки ферментативных активностей указанных клеток, детоксицирующих эти ингибиторы.

Что касается высших эукариот, то проблема метаболизма лекарств определяется статусом двух систем: глутатион-S-трансферазы и цитохрома Р-450 [36, 37]. Механизмы работы этих систем рассмотрены ниже.

2.3. О СЕКВЕСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВА В КЛЕТКЕ, ПРЕДОТВРАЩАЮЩЕЙ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МИШЕНЬЮ

В настоящее время понятие о секвестрации лекарства как о прекращении свободного его распределения в толще клетки и возможности существования в ней в каком-то обособленном ви-

де возникло в результате сопутствующих наблюдений и известны различные примеры этого явления. Изучение взаимодействия лекарства и клетки — это изучение входа, распределения, места нахождения в клетке и выхода лекарства из клетки. Второе изучено наименее, но логично, что секвестрации осуществляются на этом этапе. Классическим примером является секвестрация, наблюдаемая в случаях ионов тяжелых металлов на основе цистеинбогатых белков металлотioneинов, которые связывают эти ионы, что обезвреживает их [38]. Интенсивно исследуется секвестрация поверхностных рецепторов клетки, узнаваемых гормонами, а также возможность ухода рецептора с поверхности клетки в ее глубь, что называется интернализацией рецепторов в клетках [39, 40].

Что касается секвестрации лекарств, то для клеток эукариот известен уже упомянутый транспортер VMAT 1, а также белок LRP, идентифицированный в случае МЛУ рака легких. Белок уже описан в обзоре [14]. Это — пример не мембранного, а цитоплазматического переносчика, способного связываться с везикулами клетки. Отсюда следует, что везикулы — это возможное средство секвестрации лекарств и их выведения с помощью экзоцитоза. В связи с этим направлением интерес представляют клатрины и другие белки оболочек везикул [41, 42] и механизмы аутофагии клетки как предельный случай секвестраций [43].

О средствах секвестрации лекарств у прокариот нам ничего неизвестно, хотя, очевидно, этот механизм используется в нормальной физиологии, отвечая, например, на потребность клетки в железе. Молекулы особых агентов, обладающие хелатирующими свойствами по отношению к ионам железа, образуют специальные структуры, называемые сайдорофорами [44, 45], которые улавливают в окружающей среде, концентрируют и доставляют в клетку этот необходимый элемент жизни.

2.4. МУТИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЫ-МИШЕНИ ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРА В УЧАСТКЕ ЕГО СВЯЗЫВАНИЯ И УВЕЛИЧЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МИШЕННЫХ САЙТОВ

Поскольку молекулы белков как мишени действия тех или иных ингибиторов кодируются генами, а гены подвержены мутациям, ясно, что возможно возникновение мутантов, у которых каталитическая функция мишени сохранена, но чувствительность к ингибитору утрачена. Это возможно в том случае, когда

каталитический центр фермента и сайт, узнаваемый ингибитором, представлены разными участками последовательностей гена, кодирующего эту мишень. Продемонстрируем этот общий принцип лишь одним классическим примером, хорошо изученным генетически, биохимически и с использованием структурной трехмерной модели молекулы белка.

Клетки бактерий, грибов и растений синтезируют множество ароматических соединений, включая незаменимые ароматические аминокислоты. В этих клетках имеется специальный, так называемый шикиматный путь синтеза. Это один из самых больших синтетических путей клетки (у растений он составляет до 35 % [46]). На этом пути образуется такое базовое соединение, как шикимовая кислота, из которой с помощью многих ответвлений синтезируются соединения разной биологической активности [47, 48]. Шестой фермент этого синтеза проводит на пути образования ароматических аминокислот тирозина, триптофана и фенилаланина реакцию соединения шикимат-3-фосфата с 5-фосфоэнолпируватом, образуя необходимый предшественник на пути синтеза аминокислот. Оказалось, что химически синтезированный глифосат как фосфоновый аналог природной аминокислоты глицина способен блокировать эту реакцию [49, 50]. Связывание глифосата с пространственно отдаленным от каталитического центра мишенного фермента участком вызывает необратимый конформационный переход и полную инактивацию данного фермента. Однако если в результате мутаций происходят сугубо специфические замены аминокислот в участке связывания ингибитора [47], фермент не чувствует присутствия ингибитора и не снижает темпов проведения свойственной ему реакции. В результате этого механизма клетка приобретает цитотоксическую устойчивость, проявляемую только к данному селективному ингибитору. (Отметим, что эти разработки лаборатории профессора N. Amrhein в Цюрихе фирма «Монсанто» использовала для получения трансгенных растений, снабженных мишенью не чувствительной к глифосату, который самым широким образом используется как гербицид Раундап [48].)

При изучении механизмов устойчивости микробных клеток к различным антибиотикам также выявлено использование клеткой правила изменения мишеней их действия. Данные этого изучения представлены в обзоре [51]. На примере TEM-1 β -лактамазы возникло новое направление в изучении роли мутаций в проявлении биологической активности той или иной молекулы

белка: прежде всего, была обнаружена мутация, способная обуславливать как увеличение каталитической активности указанного белка, так и его нечувствительность к ингибитору [52]. Оказалось, что эта мутация действует в сочетании со второй мутацией, возникающей одновременно с первой мутацией в гене этого фермента. Если эта вторая мутация делает фермент неактивным, то первая исправляет или суппрессирует этот дефект за счет того, что при наличии указанной мутации в изучаемой молекуле способ укладки белка изменяется. Таким образом, существует связь между природой мутации и характером укладки белка, в котором возникают мутации. Проблеме модификации белковой молекулы как мишени действия того или иного ингибитора как механизму цитотоксической устойчивости посвящена специальная глава в монографии [53].

Суперэкспрессия генов, кодирующих молекулы мишеней действия лекарства, имеющая место при амплификации генов, нарушении *цис*- и *транс*-действующих регуляторных элементов генных активностей, при изменении статуса метилирования последовательностей ДНК, при стрессиндуцированном действии алармонов сдвигает соотношение мишенный сайт—ингибитор в сторону незанятых ингибитором мишенных сайтов [54—56]. Это позволяет клетке функционировать так, как если бы ингибитор в нее не поступал. Таким образом, суперэкспрессия гена мишени действия того или иного ингибитора — это фактор цитотоксической устойчивости.

2.5. ОБ ОБХОДНЫХ ПУТЯХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ БЛОКОВ В КЛЕТКЕ И СТРУКТУРНОЙ МИМИКРИИ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДА

Еще в рамках формулы «один ген — один фермент» было замечено, что при утрате клеткой какого-то гена и полном отсутствии соответствующей ферментативной активности наблюдаются случаи ее выживания. Ясно, что в клетке имеются какие-то возможности для компенсации такого дефекта. (При использовании техники нокаута генов эти случаи стали особо заметными.) В результате таких наблюдений возникло понятие об обходных путях того или иного метаболического блока (*metabolic bypass*). Теории этого явления еще не существует, и это — область примеров [30, 53]. Мы также остановимся на примерах, цель которых, однако, состоит в том, чтобы показать, что одним

из эффективных способов исследования обходных путей является изучение артефактов клонирования. Эти артефакты возникают при комплементации (восстановлении недостающей клетке функции) дефектных клеток-реципиентов, лишенных того или иного гена, с помощью введения в них на основе мультикопийных плазмид таких генетических последовательностей, в которых этот ген точно содержится. Результатом такого клонирования должно быть обнаружение фрагмента ДНК, содержащего недостающий клетке ген. Однако оказалось, что возможно обнаружение фрагментов ДНК, не содержащих искомым ген и тем не менее комплементирующих функцию, недостающую клетке. Такие фрагменты принято считать артефактами клонирования, и мы обратили внимание на то, что они представляют собой клеточные средства, с помощью которых возможен обход метаболического блока той или иной функциональной молекулы клетки [60].

Пути синтеза пуринов досконально изучены. Это три самостоятельных пути, используемые клеткой. Первый путь — синтез *de novo* на основе первоначально используемых молекул определенных аминокислот, сахаров и большого потребления АТФ. Второй путь — это *salvage*, дополнительный путь, путь реутилизации или вторичного использования оснований, образующихся в результате распада нуклеиновых кислот. И третий путь — это шунт, соединяющий первые два пути [57—59]. Если каждый путь и шунт перекрыть мутацией так, что клетки не смогут жить без добавления экзогенного пурина, и с помощью библиотеки генов из нормальных клеток клонировать фрагменты, комплементирующие такие мутации, то должно быть лишь только три типа таких фрагментов. Однако их клонируется больше [60]. Ясно, что «лишние» типы отражают возможности клетки обходить блок. (Отметим, что один из типов клонированных фрагментов указывает на связь с ферментами, контролирующими образование в клетке алармона—ppGpp [61, 62].)

Подтверждением того, что изучение «артефактов» клонирования может быть методом изучения обходных путей, служит работа [63]. Здесь дефектные по системам репарации одностранных разрывов клетки, чрезвычайно чувствительные к УФ-излучению, трансформировали банком генов в мультикопийных плазмидах и отбирали клоны, устойчивые к УФ. Анализ таких клонов показал, что данный дефект исправлялся с помощью неожиданной активности, проявляемой клонированным фрагментом. Это была активность RNase T, которая необходима для процес-

синга tRNA и 5S RNA. Если клонированный фрагмент содержал ген, ответственный за проявление активности RNase T, и клетки, трансформированные мультикопийными плазмидами, содержащими данный ген, утрачивали чувствительность к УФ-облучению, то это может быть только в том случае, если RNase T наряду с РНКазной обладает и ДНКазной активностью 3'-5'-полярности. Действительно, между необходимыми для репарации однонитевых разрывов ДНК экзонуклеазами и геном, проявляющим активность RNase T, наблюдается значительная гомология. Таким образом, клонирование фрагментов ДНК по способности их комплементации дефекта той или иной функциональной активности клетки позволяет устанавливать возможные пути обхода какого-либо метаболического блока в клетке.

Вопрос о возможности структурной мимикрии сайта связывания ингибитора какой-либо молекулой клетки, не являющейся молекулой-мишенью действия ингибитора, рассмотрен в главе 12.

Итак, изучение обходных путей инактивированной с помощью лекарства как ингибитора данной молекулы-мишени его действия важно при изучении лекарственной устойчивости клетки и при изучении биологии клетки вообще.

2.6. О БЕЛКОВО-БЕЛКОВОЙ ЗАЩИТЕ В КЛЕТКЕ МОЛЕКУЛЫ-МИШЕНИ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВА

Хотелось бы привлечь внимание читателя, изучающего различные защитные средства клетки, к такому недавно обнаруженному первоначально в клетках низших эукариот и прокариот явлению, как белковый сплайсинг. Суть его заключается в том, что молекула белка, синтезированная первоначально согласно генетическому коду, подвергается в клетке такой обработке, при которой какие-то части этой молекулы вырезаются, оставшиеся же фрагменты сшиваются, и молекула функционирует в такой новой форме. Смысл и значение всего этого изучают, наше же внимание привлеч факт, описанный в обзоре [64], о том, что в антибиотикоустойчивых клетках в отличие от чувствительных клеток, обнаруживаются какие-то новые белки. Они обладают способностью связываться не с молекулой антибиотика, лишая его тем самым биологической активности, а с самой мишенью, на которую действует антибиотик. Такое белково-белковое связывание как бы экранирует мишень от токсического лиганда,

что и приводит к возникновению фенотипа антибиотикоустойчивости. Кратко охарактеризуем суть этого явления.

Белковый сплайсинг, в отличие от РНК-сплайсинга, был обнаружен недавно, и целый ряд обзоров знакомит читателя с этим явлением [64—69]. Более того, существует специальный сайт в интернете, суммирующий всю поступающую информацию об этом процессе: <http://www.neb.com/neb/inteins.html>.

Созревание функциональной молекулы соответствующего белка посредством вырезания того или иного внутреннего участка, получившего название интеин (*internal protein*), с последующим сращением образовавшихся фланговых частей молекулы — экстеинов (*extein*) (рис. 2.4) установлено благодаря изучению соответствия между нуклеотидными и аминокислотными последовательностями исследуемых белков. Обнаружены белки, в которых согласно их генетическому коду определенная часть молекулы отсутствовала. Относительно генов, кодирующих такие белки, и на генетическом уровне показано, что существуют разные аллели генов этих белков. Одни из них содержали протяженные кодирующие участки, соответствующие интеинам, вырезаемым из молекулы белка, с последующим сплайсингом образующихся флангов. Другие гены белков этого типа вообще не содержали участки, кодирующие интеины. Это было названо соответственно плюс- и минус-аллелями соответствующего гена. Однако в функционирующем белке даже в случае плюс-аллели в норме этот участок в зрелой молекуле всегда отсутствует, и с помощью мутагенеза и Нозерн-блота доказано, что его удаление из молекулы-предшественника происходит сугубо посттрансляционно после соблюдения всех трансляционных правил, определяемых открытой рамкой считывания. Вырезание интеина идет автокаталитически без привлечения каких-либо кофакторов, а лишь за счет реакционных способностей аминокислот, показанных на рис. 2.4. Эти аминокислоты маркируют в молекуле белка границы вырезания интеинов и сшивки экстеинов. В настоящее время известно, что интеины составляют две группы — классические интеины и мини-интеины (рис. 2.4, б). Наиболее яркой характеристикой классического интеина (рис. 2.4, а) является наличие двух специальных доменов в его структуре.

Это так называемый домен Hint, ответственный за создание такой третичной структуры интеина, в которой N- и C-концы сближены на расстояние ковалентной связи. Это важно для осуществ-

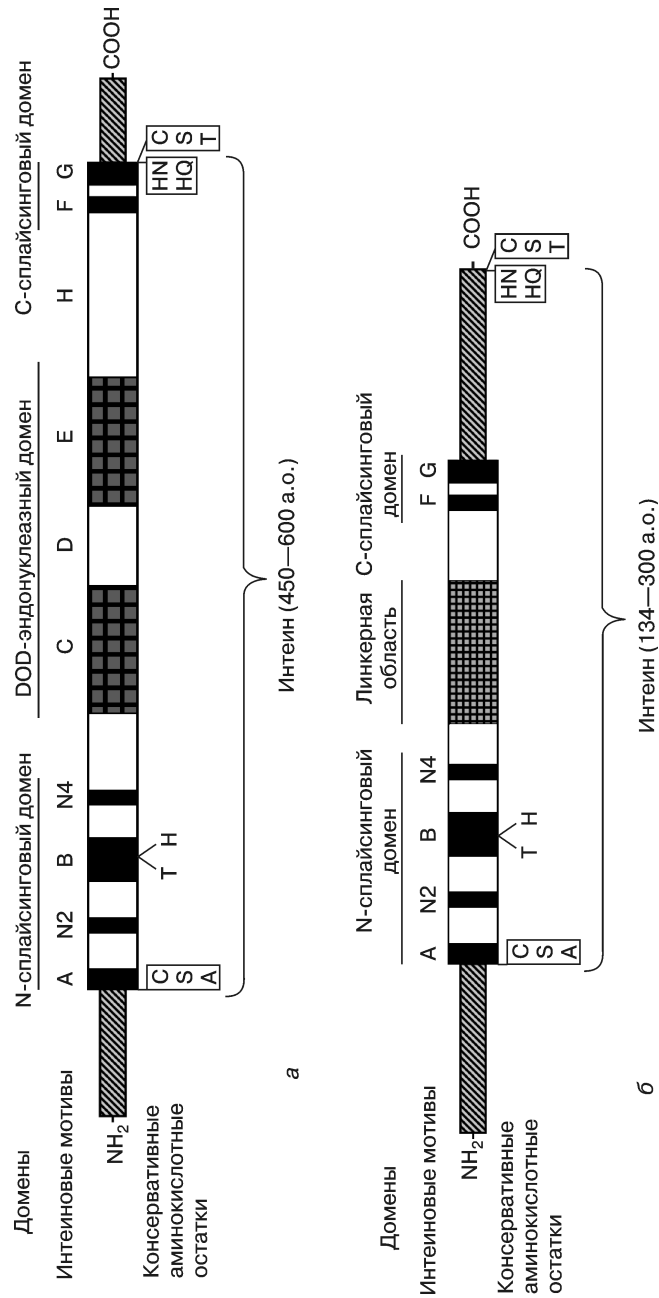


Рис. 2.4. Схематическое строение основных типов интеинов клеточных белков:
а — классический DOD-содержащий интеин; *б* — мини-интеины [69]

ления реакции вырезания интеина и сшивки флангов. Второй домен, располагающийся в центре классического интеина, называется DOD-домен. Это — белковая последовательность, очень похожая на такой белок, как специальная ДНК-эндонуклеаза, которая способна узнавать строго специфические участки в последовательности ДНК. Благодаря этой ферментативной активности в этом месте ДНК, представленной геном сплайсируемого белка, возникает двойной разрыв. Это делает возможной реакцию гомологической рекомбинации в диплоидных организмах между как плюс-, так и минус-аллелями гена данного белка так, что минус-аллель превращается в плюс. Поскольку механизм такой передачи связан лишь с определенными местами молекулы ДНК, то такое внедрение элементов в геном лишь по определенному адресу получило название хоуминга (жилища для элемента). Таким образом, благодаря активности DOD-домена возможно сохранение на генетическом уровне информации об интеинах в молекулах белков, и DOD-домен защищает их от возможности исчезновения. Если клетка располагает специальным механизмом сохранения такой сущности клетки, как интеины, то это указывает на их важность в биологии клетки, что еще предстоит раскрыть.

Обнаружение к 2005 г. примерно 200 интеинов разных белков из всех трех доменов жизни на Земле позволило установить различные типы молекулярной организации этих элементов, молекулярные сигналы для их опознавания и вырезания, а также суть катализируемых интеином без всякой посторонней помощи химических реакций, лежащих в основе этого процесса. Наиболее трудно поддается изучению биологическая значимость существования этих элементов в природе. Известно лишь, что у туберкулезной палочки и других микобактерий невырезанные интеины в таких молекулах, как основной белок рекомбинации и репарации RecA и DnaB хеликаза, необходимая для продвижения в молекуле ДНК репликационной вилки, не позволяют этим молекулам осуществлять их функцию. Это снижает жизнеспособность данной микрофлоры, особенно в присутствии агентов, вызывающих повреждения ДНК [67]. Отсюда следует, что для медицинских целей необходимы средства, предотвращающие вырезание интеинов, и что процесс белкового сплайсинга, выявленный у туберкулезного возбудителя и не обнаруженный в клетках человека, можно рассматривать как новую, перспективную мишень для поиска антимикобактериального лекарства, ингибирующего этот процесс. Вот такую возможность нового фармацевтического подхода предоставило открытие явления белкового сплайсинга. Существует

ли еще какое-то биологическое значение интеинов? В связи с этим возникает и другой вопрос о судьбе в клетке и биологических эффектах вырезанного интеина. Происходит ли просто немедленное и полное уничтожение в клетке этого элемента или она успевает использовать его в каких-то целях?

Оказалось, что размер этого элемента может колебаться в широких пределах — от более сотни до более тысячи мономеров. Выявилось, что это связано с бифункциональной доменной организацией интеинов, обеспечивающей как вырезание интеина из молекулы белка, так и перенос данной последовательности в соответствующий ген, лишенный такой последовательности. Размер этого элемента зависит от того, всеми ли доменами обладает интеин или какая-то их часть утрачена. Более того, удивительной оказалась возможность существования интеинов вообще в виде расщепленной формы, кодируемой генами различных участков генома: одна часть данного интеина в каком-то одном гене, другая — в совершенно ином гене. Однако возможно восстановление целостности интеина за счет транс-сплайсинга между разными молекулами белков, несущими отдельные участки одного и того же интеина. Как же они находят друг друга и как восстанавливается целый интеин за счет образования пептидной связи между разорванными частями молекулы? Это необходимо выяснить.

Итак, открытие такого функционального элемента клетки, как интеин, способного прежде всего к генетическим транспозициям как средству своего сохранения в природе, поднимает вопрос о значимости этого элемента для биологии клетки в целом. В настоящее время считается, что регуляция активности гена не может быть связана с соответствующим поведением интеинов. Так, было показано, что процесс белкового сплайсинга протекает в физиологических условиях очень быстро и в обычных условиях роста клетки выделение молекулы-предшественника не представляется возможным. Более того, оказалось, что различные изменения в условиях роста клетки не отражались на эффективности срачивания экстеинов, и это демонстрирует отсутствие у интеинов регуляторных свойств. Однако при таком экспериментировании остались не изученными поведение и судьба интеинов, освобождающихся из белка-хозяина. Всегда ли это поведение одинаково или оно изменяется в зависимости от условий функционирования, в которые попадает клетка? Не может ли клетка в условиях химического стресса использовать такие готовые, стандартные и специально структурированные элементы, способные к белково-белковым взаимодействиям (о чем свидетельствует явле-

ние транс-сплайсинга) для защиты функционирующих белковых мишеней от поступающих в клетку токсических лиганд? В настоящее время это чисто умозрительный вопрос, однако попытка получения экспериментального ответа на него может оказаться полезной для развития интеиновой тематики и анализа поступающих данных.

2.7. О БИОПЛЕНКАХ

В последнее время установлено, что в местах бактериальной инфекции на уровне организма хозяина, а также инкубирования бактериальной популяции не в лабораторных условиях, а в естественной окружающей среде рост бактерий приобретает специфические свойства так, что клетки вместо планктонного существования образуют связанные сложные неразделяемые структуры, так называемые биопленки (*biofilms*) [70—72]. Много работ посвящено изучению этого явления. Оказалось, что при росте в виде биопленок бактерии приобретают устойчивость к антибиотикам. Это осложняет терапию бактериальных инфекций легких, включая туберкулез, мочеполовых путей, частые воспаления среднего уха, инфекций ротовой полости, а также часто встречающуюся стафилококковую и стрептококковую инфекции [73]. Вначале думали, что пленка — это просто механический барьер, предотвращающий поступление вещества в клетку. Однако оказалось, что клетки в пленке характеризуются функциональной гетерогенностью так, что одни клетки теряют свою жизнеспособность [74], другие, получившие название *persistors*, начинают выдерживать большие концентрации цитотоксических веществ. Какие-либо различия в составе генов между клетками в биопленках и планктонной культуре не обнаружены [74]. Однако оказалось, что при образовании биопленки активируется совершенно новая транспортная система выброса веществ из клетки, которая не работает в случае планктонных клеток [75]. Почему же образуется пленка? Оказалось, что факторы, способствующие этому, связаны с индукцией белков типа поверхностного адгезина, склеивающего клетки (идентифицирован белок *Var* — *biofilm matrix polymer*), и таких веществ, как поли-N-ацетилглюкозамин полисахарида поверхности клетки и лактонов ацетилглюкозамин, а также наличия в окружающей среде экстрацеллюлярной ДНК, различных металлов и соответствующей плотности клеток [75—81]. Технология микроэррея позволяет сравнить профиль экспрессии генов клеток, существующих в свободном состоянии, и клеток, образующих пленку [82]. Обнаружение генов, резко изме-

няющих свою активность в клетках биопленки по сравнению с планктонными клетками, открывает перспективы изучения механизмов образования биопленок, свойств, проявляемых ими, и методов борьбы с этим явлением в медицине.

Укажем на первые шаги, предпринимаемые на пути разработки методов, позволяющих разрушать пленки. Клетки, образующие пленку, заражали с помощью бактериофага, к которому эти клетки были чувствительны. Но поскольку сам бактериофаг проявлял очень низкую активность и не мог разрушить пленку, то в его геном был введен известный ген фермента, деградирующего клеточный матрикс. В случае заражения клеток биопленки с помощью такого инженерного фага ее разрушение в модельном опыте составило 100 % [83]. Такой результат привлекает внимание в связи с поиском возможности, позволяющей повышать эффективность терапии туберкулеза и других опасных инфекций.

Итак, эффективность использования химиотерапевтических средств, предназначенных для уничтожения клеток, вызывающих ту или иную патологию организма, связана, прежде всего, с процессами входа вещества в клетку, возможностью его беспрепятственного распределения в толще клетки, а также его выброса из клетки. В связи с этим изучение описанных в этой главе многочисленных белков, ответственных за транспорт различных веществ, занимает одно из центральных мест в решении проблемы возникновения лекарственной устойчивости.

Изучение характера распределения вещества в клетке требует установления факта, что данная клетка не обладает ферментативными активностями, разрушающими или изменяющими химическую природу лекарства. И даже когда этого не происходит, свободное распределение в клетке лекарства наблюдается не всегда, так что доступ его к клеточным молекулам — мишеням действия лекарства в силу тех или иных причин становится невозможным. Происходит интернализация лекарства, его инертное, обособленное существование в клетке, или секвестрация (ранние наблюдения оперировали термином протоцитоз — *protocytosis*). Когда и как происходит секвестрация, еще предстоит изучить.

В проблеме лекарственной устойчивости при нормальном функционировании систем транспорта лекарства значение имеет состояние молекулы — мишени действия лекарства. В ней не должно быть мутаций, изменяющих сайт связывания лиганда, используемого как лекарство, и концентрация такого сайта не должна быть повышена в результате амплификации гена, кодирующего мишень.

Как уже отмечено, возможность связывания лиганда с молекулой-мишенью, что приводит к инактивации функциональной активности последней, не всегда означает достижение желаемого результата и прекращения роста клеток. Наблюдения показывают, что при каких-то возникающих в клетке условиях становится возможным выполнение другими молекулами функции инактивированной мишенной молекулы (*metabolic bypass*). В настоящее время прогресс в изучении этого явления связывают с успехами развития системной биологии, которой посвящена глава 11.

Использует ли клетка такие механизмы, которые непосредственно защищают молекулы-мишени от физического связывания с лигандами? В поиске ответа на этот вопрос внимание привлекают такие элементы белкового сплайсинга, как интеины. Способность этих элементов к транс-сплайсингу свидетельствует о возможности их взаимодействий с белками так, что сайт связывания лиганда в молекуле-мишени может быть покрыт посторонним полипептидом при таком взаимодействии. (Отметим, что при изучении аланил-тРНК-синтетазы впервые удалось наблюдать комплементацию функции на уровне белковой молекулы. В этом случае происходило восстановление термолabileного дефекта этого фермента за счет взаимодействий с полипептидами, считываемыми с генов, кодирующих лишённые каталитической активности куски полипептидных цепей этого фермента [85].)

Обнаружение такого явления, как образование в случае микробных клеток единой структуры биопленок из свободноживущих клеток, чувствительные молекулы-мишени которых становятся почему-то устойчивыми к действию цитостатиков, очевидно, предоставляет возможность раскрытия каких-то новых закономерностей, лежащих в основе биологии клетки. В настоящее время это — область интенсивных исследований.

Итак, разнообразие форм хемоустойчивости клетки в настоящее время затрудняет установление истинной причины лекарственной устойчивости в каждом конкретном клиническом случае и при полученных академических знаниях в силе остается эмпирический подбор фармацевтических средств, вызывающих желательный ответ пациентов. Однако, как будет отмечено в конце книги, на этом пути становится возможным обнаружение средств, значительно ускоряющих возможности такого подбора.

Разнообразие форм хемоустойчивости также поднимает вопрос о роли генетической организации клетки в осуществлении ее противохимической обороны и этому вопросу посвящена следующая глава книги.

СИСТЕМЫ ГЛОБАЛЬНОГО ОТВЕТА КЛЕТКИ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ ЕЕ ПРОТИВОХИМИЧЕСКУЮ ЗАЩИТУ

Условия среды обитания клетки подвержены изменениям, поэтому возникает вопрос о возможности сохранения ее жизнеспособности в различных условиях. В настоящее время известно, что факторы, способные нарушить стабильное функционирование клетки, вызывают в ней состояние стресса, и клетка снабжена специальными средствами ответа на стресс, включающими механизмы защиты от инактивации систем жизнеспособности клетки. В случае же вредных воздействий на клетку оказалось, что ее ответ на это воздействие связан с активацией не каких-то отдельных специфических генов, а одновременно многих различных генов, разбросанных по всему геному. В связи с задействованием всего генома в ответе клетки на стресс и координированной активацией целого ряда разбросанных по геному генов эта группа защитных механизмов клетки получила название систем глобального ответа, представленных в прокариотической клетке, в основном, глобальными регулонами. Если при оперонной организации генов прокариот координированность считывания информации с генов оперона достигается за счет их расположения в сцепленном виде в одном месте генома и управления с общей для всех них регуляторной области, то это не так в регулонах.

Координированность же разбросанных по всему геному генов регулонов осуществляется узнаванием специальными регуляторными белками (репрессорами и транскрипционными факторами) регуляторных областей, которыми обладает каждый ген регулона.

В настоящее время известно, что за выживание клетки в условиях стресса отвечают различные генетические системы. Условно их можно разделить на две группы: одна из них связана со специальными, эволюционно закрепленными системами генов, ответственными за синтез так называемых стрессовых белков, призванных нивелировать действие стресса; другая группа — это самооргани-

зующиеся системы защиты клетки от внешних ударов, связанные с транспозициями мобильных элементов генома [1].

Установлено, что в функцию глобальных регулонов защиты входит осуществление процессов по предотвращению возможной денатурации жизненно важных клеточных белков, ликвидации появившихся в клетке активных химических групп, особенно в случае проникновения алкилирующих соединений. Более того, в их функции также входят репарация двойных разрывов в молекуле ДНК (SOS-репарация), устранение образующихся в клетке мощных оксидантов в виде супероксидных анионов кислорода — ROS (*reactive oxygen species*). Стрессовые белки ответственны и за процессы инактивации биологической активности метаболических ингибиторов, а также за возможность интернализации лекарства в клетке.

Отметим, что вопрос о связи между химически индуцированными защитными реакциями клетки и возникающей лекарственной устойчивостью был поднят еще в обзоре [2]. Для клеток прокариот эти защитные реакции составляют 6 известных глобальных регулонов, предназначенных для защиты клеток в разных условиях стресса: 1) SOS-репарация от повреждений ДНК [3, 4]; 2) *ada*-защита от алкилов [5]; 3) *oxy R*-защита от окислительного стресса [6–8]; 4) *hsp*-защита от теплового шока и других видов стрессов [9]; 5) *Mar/sox/gob*-регулон, защищающий клетки от антибиотиков и некоторых ксенобиотиков [10]; 6) система защитных ацетилтрансфераз, детоксифицирующих антибиотики и ксенобиотики [10]. При индукции этих регулонов наблюдалась устойчивость клеток и к некоторым другим клеточным ингибиторам [2]. 20 лет назад механизм такой неспецифики был неизвестен и остается таким и сейчас. (Можно ли предположить, что индукция синтеза огромного количества белков, принадлежащих этим регулонам, — это фактор заполнения клетки белковой массой, способной перекрывать внутриклеточные потоки вещества в клетке и приводить к их секвестрации?)

Системы глобального ответа клетки на различные внешние воздействия широко описаны в литературе и обобщены в книге [11]. В настоящее время в связи с проблемой антибиотикоустойчивости особое внимание уделяется изучению пятой системы глобального ответа клетки, связанной с функционированием определяющей фенотип этой устойчивости *mar/sox* регуляторной сети, обнаруженной в клетках *E. coli* (см. обзоры [12, 13]). Кратко опишем эту систему.

При изучении тетрациклиноустойчивого мутанта, устойчивого одновременно к различным неродственным антибиотикам, обнаружен специальный локус генома, названный *mar* (multidrug antibiotic resistance), от состояния которого зависит фенотип устойчивости. При изменении структуры этой области за счет вставки в нее транспозона индукция Mar-фенотипа становится невозможной. С помощью комплементации *mar* делеционного мутанта был клонирован фрагмент геномной ДНК, содержащий оперон *mar RAB* [14–18]. *mar R* кодирует репрессор этого оперона, *mar A* — транскрипционный фактор, очень похожий на *ara C*, необходимый для позитивной регуляции арабинозного регулона [19]. Следовательно, с экспрессией фактора Mar A связана индукция определенных генов, обуславливающих Mar-фенотип. Прежде чем их характеризовать, кратко опишем следующие наблюдения.

Известно, что появление в клетке супероксидных анионов кислорода — ROS [20] приводит к индукции определенных генов. Она связана с функциональной активностью специального участка гена *sox R* [21], расположенного на 92-й минуте генетической карты кишечной палочки [22]. Однако один из мутантов Sox-фенотипа картировался не на 92 мин, а в области *mar* (34 мин карты генома *E.coli*) (см. обзор [12]). Оказалось, что мутанты с фенотипом Sox R обладали и фенотипом Mar [21]. Изучение локуса *sox R* показало, что тут расположено два гена, ориентированных противоположно: один из них — *sox R*, другой — *sox S*. Оказалось, что появление в клетке ROS обуславливает переход неактивного Sox R в активную форму. Она индуцирует экспрессию *sox S*, ответственного за индукцию многих несцепленных генов единого регулона. Sox S, как и Mar A, гомологичен транскрипционному фактору Ara C [19].

При изучении белков необходимой для начала репликации геномной ДНК праймосомы *ori C* (точка начала репликации) был обнаружен белок Rob [23, 24], обладающий значительной гомологией с транскрипционными факторами Mar A и Sox S. Ясно, что *mar/sox/rob* — это целая сеть управления активностью системы, отвечающей за устойчивость клеток к внешним и внутренним стрессовым агентам. Управление осуществляется с помощью узнавания специальных геномных последовательностей — *marboxes* [25, 26], связывание которых с репрессором Mar R выключает оперон *mar RAB*. Слабые кислоты (салициловая) инактивируют репрессор и открывают оперон. Такой же

эффект обнаружен у некоторых фенольных соединений растений [27, 28].

При изучении составляющих данный регулон генов обнаружено, что их можно разделить на две группы. Одни необходимы для образования антисмысловой РНК, блокирующей трансляцию матрицы для синтеза специальных белков — пориновых каналов так, что клетка закрывает свои входы [29—33]. Другие гены необходимы для активации работы насоса, откачивающего молекулы из бактериальной клетки наружу (гены *acr AB* и *tolC*, см. рис. 2.2) [32, 33].

К системам глобального ответа клетки, защищающего ее от различных антибиотиков в основном аминокликозидного ряда, относятся обнаруженные у многих бактерий ацетилтрансферазы, кодируемые хромосомными генами. Наличие таких ферментов в клетке указывает не только на необходимость защиты клетки от аминокликозидных антибиотиков, но и на обязательность ацетилирования конкретных клеточных субстратов. Наиболее изучена ацетилтрансфераза, описанная в работе [34]. Данный фермент приобретает ацетиловую группу из образующего клеточную стенку пептидогликана, а также N-ацетилглюкозамина и ацетилкоэнзима (coA). Ацетилирование пептидогликана — необходимая модификация для запуска работы автолитических ферментов, осуществляющих как разрушение пептидогликана, так и его обновление. Регуляция активности кодирующего ацетилтрансферазу гена — *aac(2′)-1a* связана с активностью специального *aar*-локуса генома клетки. Здесь обнаружены и позитивные, и негативные гены-регуляторы синтеза этого фермента, более того, в регуляции принимают участие сенсорные механизмы состояния плотности бактериальной популяции — *quorum sensing* [10]. (Установлено, что к началу стационарной фазы роста клеток накапливается некий внеклеточный фактор AR, начинающий цепь регуляций синтеза пептидогликана [35].) Интересно, что в отношении узнавания стрессовых агентов для описанных регулонов характерно разделение труда: *mar/sox/rob* нейтрализует антибиотики тетрациклинового ряда и не реагирует на аминокликозиды, защиту от которых осуществляют ацетилтрансферазы, кодируемые как хромосомными, так и плазмидными генами, обуславливающими детоксикацию применяемых антибиотиков.

Поскольку различные алкилирующие соединения обладают высокой реакционной активностью, способной атаковать многие

молекулы клетки и в первую очередь особенно ДНК, возникла перспектива использования их в качестве фармакологического средства, обуславливающего модификации нормальной структуры геномной ДНК, что препятствует ее функционированию. Поскольку микробные и злокачественные клетки размножаются с высокой скоростью по сравнению с нормальными клетками организма, это повышает вероятность модификаций ДНК, а отсюда и уничтожения в первую очередь этих нежелательных клеток. Однако на этом пути на защиту клетки от такой химиотерапии встала возможность индукции синтеза белков так называемого *ada*-регулона, которые репарируют повреждения в ДНК, возникающие при алкилировании [36]. Белки этого класса получили общее название алкилгуанин-ДНК-алкилтрансфераз (AGT). (Специфичность ферментов, узнающих алкильные аддукты ДНК, различается: одни удаляют их из O⁶-положения в гуанине, другие — из O⁴-положения в тимине.) В настоящее время в случае клеток прокариот изучение сосредоточено на белках, кодируемых четырьмя генами: *ada*, *alk B*, *alk A* и *aid B*. В случае эукариот в центре внимания находится O⁶ — метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза — MGMT. (Иногда в литературе слово ДНК в названии фермента опускается [37].) Кратко охарактеризуем эти исследования.

При изучении функции белков *ada*-регулона оказалось, что три из них — *ada*, *alk A*, *alk B* — являются репарационными белками, удаляющими метильные группы из молекулы гуанина ДНК, белок же, кодируемый геном *aid B*, разрушает само алкилирующее соединение.

Изучение *ada*-белка показало, что это — O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, узнающая метильную группу в этом положении гуанина и отщепляющая ее так, что эта группа присоединяется к цистеиновому остатку фермента — Cys-321. В результате фермент инактивируется и подлежит деградации. Поэтому эту группу белков в литературе иногда называют белками-камикадзе.

Отметим, что если в клетке может сложиться ситуация, при которой в адаптивном ответе с участием *ada*-регулона происходит внутриклеточное накопление неметилированной формы *ada*-белка (более 200 молекул на клетку), то имеющиеся в клетке метилированные его формы способны каким-то образом выключить этот регулон и прекратить синтез данного белка. Как это происходит, еще предстоит выяснить.

Белок alk В функционирует в клетке как ДНК-диоксигеназа, субстратом которой служат 1-метиладенин и 3-метилцитозин. Фермент особо активен в случае одноцепочечной ДНК, в связи с чем считается, что в его функцию входит охрана вилок репликации и транскрипционных пузырей [37].

Белок alk А функционирует как ДНК-гликозилаза, обладающая широкой специфичностью действия. Это такой фермент, который репарирует молекулу ДНК, вырезая испорченное основание так, что сахарофосфатный остов не нарушается, N-гликозидная связь (между сахаром и основанием в молекуле ДНК) расщепляется. Описаны многочисленные места репарации с помощью этого фермента [37]. Ясно, что изучение указанных активностей в случае репараций ДНК эукариот представляет интерес, но в настоящее время основное внимание в исследованиях этого класса репарационных ферментов сосредоточено на изучении O⁶-алкилгуанин-ДНК-алкилтрансфераз и в частности на O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазе.

Поскольку MGMT исправляет повреждения, которые возникают в ДНК в результате химиотерапии с использованием алкилирующих соединений, то активность этого фермента выступает в качестве фактора устойчивости клеток к действию антираковых средств и, следовательно, MGMT нужно инактивировать. Этой проблеме посвящен всесторонний обзор [38].

Итак, при применении алкилирующих соединений в химиотерапии раковых заболеваний необходимо определять уровни экспрессии гена и активности в клетках белка MGMT и обладать возможностью держать функцию этого фермента под контролем. (Более того, при таком подходе нужно также следить за усилением эффектов MGMT за счет активности транслезионной полимеразы Rev3L, которая как попало заполняет основаниями места повреждения в ДНК, не допуская ее разрушения [39].) В настоящее время получены результаты, показывающие, что при возможности взаимодействия в клетке белка p53 и транскрипционного фактора Sp1 синтез MGMT снижается [40]. Такой же эффект вызывает интерлейкин-24 [41]. Метилирование промотора MGMT ведет к уменьшению синтеза данного белка [42], такой же результат дает метилирование промотора гена белка p73, что указывает на то, что этот белок может быть транскрипционным фактором гена MGMT [42]. Результаты изучения влияния на эффективность репарации ДНК эпигенетических изменений в генах, ответственных за этот процесс, суммированы в обзоре

[43]. Интересен вопрос о влиянии псевдосубстратов на активность MGMT. Таким псевдосубстратом является 6-бензилгуанин (6-BG), в присутствии которого аддукты ДНК данным ферментом не удаляются. Более того, при использовании 6-BG как химиотерапии в случае рака поджелудочной железы наблюдали блокаду экспрессии MGMT, задержку роста опухоли и апоптоз ее клеток [44].

Интересен связанный с состоянием в клетке MGMT аспект эффектов, проявляемых стволовыми клетками. Оказалось, что среди клеток, выделенных из костного мозга, находятся клетки, обладающие характеристиками легочного эпителия. Эти клетки способны дифференцироваться, образуя легочную ткань, но выход их чрезвычайно низкий. Однако если использовать такой же материал, но полученный из организмов, проявляющих устойчивость к действию ингибитора MGMT, что связано с его перепроизводством в клетке, то выход искомым клеткам увеличивается. Они способны включаться в легочную ткань, и это представляет большой интерес для клинических и терапевтических целей [45]. Интересные результаты получены при введении в стволовые клетки крови 140K мутантной аллели MGMT, кодирующей фермент, не чувствительный к ингибитору. Установлено, что чем выше уровень экспрессии этой аллели в стволовых клетках, трансформированных с помощью содержащих такую аллель ретровекторов, тем эффективнее алкилирующие соединения элиминируют такие клетки [46]. Оказалось, что мутантный белок в отличие от нормального белка постоянно находится в ядре и хроматине, и это каким-то образом затрудняет прохождение клеточного цикла, а отсюда и размножение клеток. Ясно, что рамки изучения MGMT и роли этого фермента в биологии клетки и организма расширяются и будущее даст все новые и новые результаты.

Итак, в проявлении клеткой признака той или иной хемотройчивости задействованы такие механизмы ее защиты от токсических воздействий, которые связаны с функционированием специально предназначенных для этого глобальных регулонов. При изучении клеток прокариот особенно большое внимание уделяется *marAB*-локусу генома, возможность инактивации которого позволяет антибиотикам эффективно входить в клетку и не быть выброшенными из нее. С целью преодоления хемотройчивости

ности внимание привлекает также возможность инактивации таких ферментов этих клеток, как ацетилтрансферазы, модифицирующие химическую природу антибиотиков, что лишает их действенного начала. В случае клеток эукариот в настоящее время в центре исследований находятся ферменты регулона, защищающие геном клеток от генотоксического действия алкилирующих соединений. Поскольку такие соединения используют в химиотерапии рака, ясно, что успешность терапии в этом случае также определяется возможностью инактивации ферментов этого типа. На пути поиска таких возможностей большое внимание привлекает факт обнаружения в самое последнее время того, что активность данных ферментов зависит от состояния метилированности промоторов и транскрипционных факторов генов этих белков.

**ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВА
И ЗАЩИТНЫЙ ОТВЕТ КЛЕТКИ НА СТРЕСС:
I. МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ,
ПЕРЕСТРОЙКИ ГЕНОМА, АНЕУПЛОИДИЯ
И ХЕМОУСТОЙЧИВОСТЬ**

Борьба с микробными инфекциями и онкологическими заболеваниями подразумевает возможность уничтожения микробных и злокачественных клеток в организме. (Отметим, что в последнем случае высказывается прямо противоположный взгляд, обосновывающий преимущества использования стратегии, связанной не с уничтожением раковой клетки, а с возможностью лишь исправления ошибок в программе дифференцировки такой клетки.) Уничтожение клетки в клинической практике наиболее рентабельно с применением химических средств как ненужных клетке малых молекул, способных поступать в нее, взаимодействовать с ответственными за жизнеспособность клетки структурами и выводить их из строя. Таким образом, лекарство, представленное такими молекулами, выступает в роли клеточного стрессора и, следовательно, клетка должна включать механизмы защиты от его действия.

В настоящее время известно, что за выживание клетки в неоптимальных условиях ее жизни в ситуации стресса отвечает молекулярный уровень ее организации, связанный с функционированием различных генетических систем. Укажем, что статус научного термина слову «стресс» придал Ганс Селье, создавший учение о стрессе на организменном уровне в первой трети XX в. [1], столетие со дня рождения которого было отмечено в 2007 г. [2].

Установление факта, что при различных напряжениях в организме появляется такая молекула, как адреналин, позволило Уолтеру Кеннону сформулировать теорию гомеостаза как состояния полной сбалансированности всех процессов организма. Отсюда вытекало, что стресс — это нарушение гомеостаза, вызываемое действием стрессоров — различных внешних и внутренних факторов. (Интересным оказалось то, что ответ организма на это нарушение запрограммирован в виде суммы соответствующих реакций различных физиологических систем, получив-

ших название общего адаптивного синдрома — *General Adaptive Syndrome* — GAS.) Гомеостаз и стресс — также неотъемлемые понятия биологии не только организма, но и клетки. Существует ли и каков запрограммированный GAS на уровне клетки?

Прежде всего, предстояло определить, какие же генетические системы определяют способность клетки к выживанию в различных условиях. Как уже указывалось, условно эти системы можно разделить на две группы: самоорганизующихся систем и систем неизменного генетического состава, перманентно использующихся по специальному назначению. Первая из них призвана нивелировать отрицательное влияние на клетку в связи с непредвиденными обстоятельствами ухудшения условий ее функционирования. Такое нивелирование может происходить за счет изменения характера экспрессии соответствующих генов, а также соответствующих структурных изменений генома в зависимости от возникших обстоятельств функционирования клетки. Изменения же в характере экспрессии этих генов, а также активации структурной реорганизации генома можно достичь за счет транспозиций мобильных генетических элементов (МГЭ), перемещение которых из одних мест генома в другие и способно определить изменение картины активности генов. Другая группа этих систем представлена специальными, также закрепленными эволюционно быстродействующими системами передачи сигналов и системами генов глобального ответа клетки, охарактеризованных в главе 3.

Итак, при функционировании клетки в токсических условиях стрессовый ответ клетки может проявляться как изменения в таких основных четырех процессах: пролиферация/канцерогенез, остановка роста/дряхление, воспалительные реакции и смерть клетки. Ясно, что в этих процессах должны быть задействованы гены, отвечающие на окислительный и метаболические стрессы, тепловой шок, повреждения ДНК и их репарацию, старение клетки (*cell senescence*), а также гены, обуславливающие смерть клетки. В настоящее время известно, что в случае даже более просто устроенных клеток прокариот к ликвидации повреждения ДНК причастно ~30 % генома, или более 1000 генов [3]. Интересно, что при метаболическом стрессе, вызванном голоданием клеток, например по триптофану, также активируется большое число генов [4]. Более того, при изучении с помощью 630 различных микроэррэев транскрипционного ответа клеток важного в клинике патогена, спорообразующего микроба *Clostridium difficile*, подвергаю-

щегося различным стрессовым воздействиям, был установлен профиль экспрессии генов, характерный для того или иного воздействия [5]. (Техника микроэлектронной связи связана с использованием носителей, на которых в упорядоченном виде нанесены короткие генетические последовательности, которые можно рассматривать как представителей всех участков генома. Картина гибридизации таких последовательностей с продуктами транскриптов генов, выделенных из клеток, функционировавших в соответствующих условиях, позволяет получить профиль генной активности для каждого конкретного случая.) Охарактеризуем системы стрессовой защиты клетки с подробностями, необходимыми для понимания того или иного процесса, составляющего молекулярный ответ клетки на стресс.

4.1. САМООРГАНИЗУЮЩИЕСЯ СИСТЕМЫ ХЕМОУСТОЙЧИВОСТИ: МОБИЛЬНЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ И ВОЗНИКНОВЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

Прежде всего, кратко коснемся истории открытия мобильных элементов генома, впервые описанных в опытах с мутантами кукурузы Барбарой МакКлинток, получившей Нобелевскую премию за это открытие [6]. В рамках настоящего обзора мобильные элементы представляют интерес в связи с тем, что они оказались таким молекулярным средством, с помощью которого геном может рассматриваться как специальный клеточный орган, предназначенный для восприятия отклонений в клетке от нормы ее функционирования. Более того, в результате таких восприятий он может сам себя реорганизовывать в зависимости от потребностей клетки, возникших в конкретных условиях ее жизни. Как были открыты мобильные элементы? Этот вопрос освещен в специальной литературе [7–10]. Здесь же отметим следующее.

Начало пути развития генетики отмечено такими достижениями, как возможность цитологической визуализации хромосом, их морфологического анализа в норме и патологии, установления групп сцепления генетических признаков и картирования различных генных локусов, а также открытие экспериментальных мутагенных факторов.

Оказалось, что под действием на генетический аппарат кукурузы такого мутагена, как рентген, можно получить мутанты, в гено-

ме которых произошли разломы. Однако образовавшиеся разорванные концы хромосом обязательно сливаются друг с другом, что защищает геном от деградации и обеспечивает жизнеспособность мутанта. Таким образом, ясно, что клетка обладает соответствующим аппаратом репарации разрывов, который, прежде всего, чувствует их возникновение, а также необходим для организации мер, направленных на ликвидацию этих разрывов. Естественно возник вопрос о поведении клетки в случае образования единого разрыва в геноме и вхождения в телофазное ядро куска хромосомы, содержащей только один разорванный конец. Это означает, что у разорванного конца хромосомы, поступившей в телофазное ядро, отсутствует партнер для взаимодействия, поскольку весь остальной генетический материал интактен. Такую ситуацию можно создать на основе мутанта, генотип которого характеризуется наличием хромосомы с двумя центромерами. Расхождение центромер в анафазе клеточного цикла к разным полюсам клетки приводит к образованию как бы моста между распределяемым генетическим материалом (по терминологии McClintock цикл геномных перестроек — *breakage—fusion—bridge* —разрыв—слияние—мост [6], или ВФВ-цикл, рис. 4.1, см. вклейку).

По чисто механическим причинам такой неестественно возникший мост может не выдержать создающегося напряжения и порваться в любом месте так, что в телофазное ядро образующихся дочерних клеток поступает генетический материал, имеющий только что возникший единственный разрыв. Как поведет себя клетка в таком случае? Оказалось, что в клетках, в геноме которых имеется единственный разрыв, активируются соответствующие генетические элементы, которые не функционируют и молчат без надобности в них для клетки в данных условиях. Активация же этих элементов в изученных условиях стресса изменяет характер активности соответствующих генов так, что в клетке возникают какие-то совершенно иные потенции, возможность реализации которых в сложившихся условиях обеспечит клетке выживание. Первым экспериментальным подтверждением роли активации молчащего генетического элемента стали результаты изучения характера окраски зерен, а также других частей растения кукурузы [6]. Ранее было известно, что в зависимости от состояния пути синтеза антоцианов в клетке окраска изучаемого материала может варьировать от красного до фиолетового. Один из генов этого пути был идентифицирован. Также было показано, что в аллельном состоянии, обозначенном как «а», ген неактивен. Если же в геноме возле данной ал-

лели как случайное редкое событие появляется генетический элемент, названный *Dotted* (при расположении в геноме в любом месте обуславливает окраску в виде точек), неактивная аллель «а» превращается в доминантную аллель «А» и интенсивность и характер окраски изучаемого материала меняется.

Этот феномен был использован при поиске доказательств активации молчащих генетических элементов, вызванной таким стрессовым фактором, как появление в клетке лишь одного разорванного конца в геноме и отсутствию разрывов в каких-либо других местах генома. Действительно, оказалось, что в таком случае неактивная аллель «а» активируется и происходит это за счет перемещения в локус данной аллели генетического элемента *Dotted*. Если это так в случае, который можно наблюдать, то это также возможно и в тех случаях, которые еще не описаны на механизменном уровне, а лишь выявляются по жизнеспособности мутанта как конечного результата. При наличии единого разрыва слияние концов и репарация двойных разрывов может произойти между двумя сестринскими хроматидами так, что опять образуется материал с двумя центромерами и ВФВ-цикл запускается вновь (рис. 4.1). Более того, установлен такой вид репарации двойных разрывов в ДНК, который связан с инсерцией мобильных элементов непосредственно в сайт двойного разрыва [11]. Вызывает интерес и вопрос о возможности активации теломеразы или использования отработанных теломер, сохранившихся в ядре. В настоящее время известны ядерные образования, получившие название специальных тел — PML-bodies [12]. Они способны сохранять те теломеры, которые обрезаются с концов хромосом в процессе клеточных делений. Не могут ли такие теломеры быть использованы вторично в критических случаях? Более того, в геноме дрозофилы обнаружены способные к перемещению элементы *Het-A* и *TART*, активирующиеся при повреждении теломер и каким-то образом отвечающие за сохранение концов хромосом [13].

Эти результаты изучения возможных перемещений частей генома породили новое понятие о пластичности генома и открыли эру изучения мобильных генетических элементов — МГЭ. Развитие технологий клонирования и секвенирования, а также компьютерный анализ полных первичных последовательностей геномов различных организмов позволили идентифицировать подавляющую массу мобильных элементов, выявленных в геномах всех видов нашей экосистемы. Оказалось, что, например, в

геноме человека этими элементами представлено ~45 % [10]. Краткой характеристике большого числа различных изученных мобильных элементов особенно у человека посвящен один из последних обзоров [14]. Первыми были изучены наиболее легко выявляемые МГЭ прокариот. Кратко охарактеризуем эти элементы.

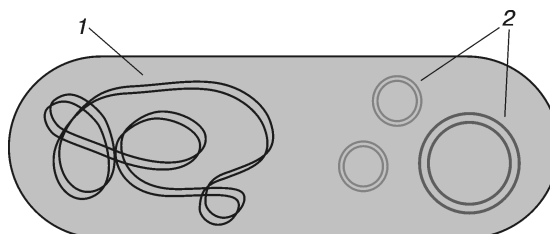
4.1.1. Краткая характеристика МГЭ прокариот

К этим элементам относятся так называемые конъюгативные плазмиды, транспозоны и интегроны. Прежде всего, в клетках кишечной палочки *Escherichia coli* были выявлены существующие отдельно от массивной замкнутой геномной ДНК небольшие суперскрученные молекулы ДНК, представляющие собой различные плазмиды (рис. 4.2).

(Возможна также хромосомная интеграция этих двух типов молекул.) Оказалось, что плазмидная ДНК способна к самостоятельному воспроизведению в клетке и обладает специальным аппаратом для ее передачи в соседние клетки — от клетки к клетке. Такой перенос генов называется латеральным, или горизонтальным, в отличие от вертикальной передачи информации от родителей детям. Были обнаружены плазмиды (*R*-плазмиды), содержащие гены, ответственные за инактивацию биологической активности многих антибиотиков. Это зачастую делает применение таких лекарств в борьбе с инфекциями бессмысленным. Ясно, что мобильный характер плазмид облегчает процесс диссеминации соответствующих генов в калейдоскопе условий функционирования того или иного генетического материала.

Обнаружение поломок гена, которые происходили из-за того, что внутрь гена встраивался какой-то иной генетический материал, привело к открытию генетических элементов, названных транспозонами. Краткий исторический обзор развития биологии транспозонов представлен в [13]. Здесь лишь отметим, что данные

Рис. 4.2. Схема локализации в клетке хромосомной (1) и плазмидной (2) ДНК



изучения структуры классических бактериальных транспозонов суммирует рис. 4.3 (см. вклейку).

Мобильная ДНК, содержащая ряд структурных генов, окаймлена специфическими повторяющимися последовательностями. Они отмечают границы транспозонов как места, узнаваемого специальным ферментом, — транспозазой, закодированной в самих транспозонах. Один из принципов работы этого фермента состоит в том, чтобы «вырезать из одного места генома данный генетический материал и вклеить его в другое», т. е. переместить его по геному. При этом транспозаза узнает в хозяйской ДНК, примыкающей к транспозону, мишенный сайт своего действия и осуществляет двойной разрыв со сдвигом так, что образуются липкие концы по правилу комплементарности оснований ДНК. Заполнение результирующей брешы в липких концах с обеих сторон транспозона с помощью ДНК-полимеразы и лигирование приводит к появлению в этом месте генома дубликации из прямых повторов небольшой протяженности. Часто это может рассматриваться как «*footprint*» («след») пребывания мобильного элемента в данном месте генома. Вырезанный МГЭ, стабилизированный через взаимодействие между концевыми обратными повторами, транспозаза может встроиться в хозяйский геном.

Существуют вариации этого процесса. Для некоторых случаев не наблюдается какой-либо избирательности, и транспозон может быть вставлен в любое место. В других случаях обнаруживаются места предпочтительного встраивания так, что даже возник специальный термин — хоуминг (*homing*) — жилище [15]. Помимо транспозонов, оставляющих «след» при своих перемещениях, есть транспозоны, не оставляющие такого следа, так как пользуются своими ДНК копиями при перемещениях, увеличивая содержание ДНК в геноме. Примечательно, что содержание гомологичной ДНК возрастает в разных частях генома. Это делает возможной рекомбинацию между ними на основе возникших гомологических участков. Такая рекомбинация называется эктопической, и она может выступать в качестве фактора перестроек генома и изменения картины экспрессии генов, особенно в условиях стресса. Транспозоны с перемещением на уровне ДНК относятся к классу II в отличие от МГЭ класса I, которые используют свои РНК копии с последующим обратным транскрибированием в молекулу кДНК как субстратом встраивания в геном.

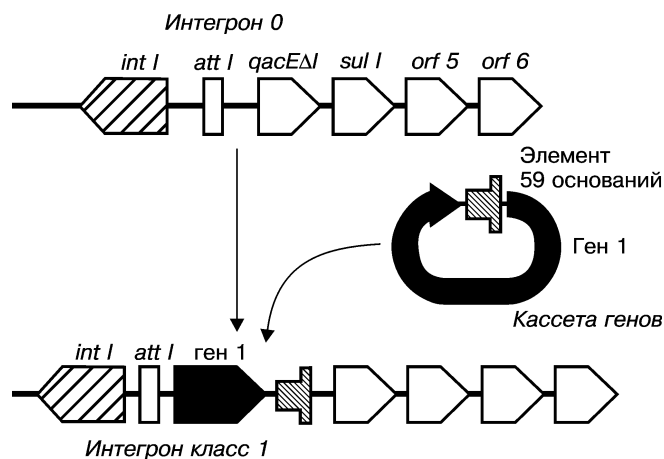


Рис. 4.4. Схема устройства интегрона [16].
Объяснение роли структур — см. текст

Более того, изучение организации последовательностей ДНК бактериальных хромосом, плазмид и транспозонов позволило выявить специальные генетические системы, способные осуществлять за счет особой сайт-специфической рекомбинации захват посторонних генов, и встраивать их как кассету в ту или иную генетическую структуру клетки. Такие гены должны лишь содержать определенную 59-членную последовательность, которая узнается в процессе рекомбинации как *att C*-сайт. Эти системы получили название интегрон. Схемы устройства интегрон и образования генных кассет приведены на рис. 4.4 и 4.5 (см. вклейку), краткая информация, характеризующая эти элементы, представлена в обзоре [16], а также в обзорах [17, 18].

Оказалось, что в клетке должны обнаруживаться различные замкнутые молекулы ДНК, достаточные по размеру для кодирования какого-то генного продукта, хотя и не содержащие промотор, однако с обязательным наличием канонической детали в 59 п. н. Такое образование и получило название генной кассеты. Как формируются такие кассеты еще неясно, хотя высказано предположение, что беспромоторная кассета могла бы возникнуть за счет обратной транскрипции мРНК, а происхождение 59 п. н. связано с такой структурой, как терминатор транскрипции, представленный шпильчатой структурой. Именно эти 59 п. н. важны для сайт-специфической рекомбинации как *att C*-сайты кассеты, которые узнаются специальной рекомбиназой — интегразой, кодируемой ге-

ном *int I* как составной частью интегрона. С одной стороны, интеграза узнает *att C*-сайт, находящийся на кассете, а с другой — *att I*-сайт, расположенный в самом интегрене. На основе этих двух элементов Int I встраивает кассету в интегрон по *att I*-сайту подобно встраиванию вирусного генома в клеточный геном, например, в случае лизогенизации клеток кишечной палочки с помощью бактериофага лямбда. Если в последнем случае для обратной реакции — вырезания вирусного генома из клеточного — необходим дополнительный белок, поставляемый фагом, то Int I может работать самостоятельно как в прямом, так и в обратном направлении.

В зависимости от различий в структурных деталях интегроны также делятся на классы. Более того, возможны диаметрально противоположные случаи: полное отсутствие кассет в интегрене и их значительное число, указывающее на возможность множества актов таких рекомбинаций. Это число может быть настолько большим, что даже дискутируется необходимость в использовании термина супер-интегрон [19]. Примечательно, что вся шпалера кассетных генов встраивается лишь в одной ориентации: в направлении от гена *int I* к сайту *att I*, подсоединяясь к промотору P_c , расположенному в области гена *int I*. Какие же гены захватываются интегронными системами? Прежде всего, это оказались гены, продукты которых позволяют обезвреживать антибиотики.

Таким образом, бактерии в связи с особым динамизмом и повышенными степенями риска своего существования наделены особым механизмом собирания по крупицам в среде обитания индивидуальных генетических средств защиты так, что в конце концов способны быстро сформировать всю нужную линию обороны и одновременно предоставить ее другим. Среди кассетных генов обнаружены и такие, которые определяют вирулентность (островки патогенности), адаптивный ответ на многие воздействия, а также гены неизвестной функции. Выявление интегронов как природных генетических систем, способных захватывать различные не родственные гены, определяя возможность их функционирования в различных условиях, указывает на то, что идея генетической инженерии — это не только результат работы человеческой мысли и открытий в лаборатории, но и результат, рожденный и постоянно используемый самой Природой.

Итак, возникновение множественной лекарственной устойчивости в микробном мире в самой существенной степени определяется мобильными генетическими элементами, поведение которых

зависит от создавшихся условий функционирования клетки, включая условия, вызывающие стрессовые состояния клетки. Каковы же МГЭ высших организмов и существует ли столь же важная связь между ними и множественной хемотройчивостью в этом случае?

4.1.2. Краткая характеристика МГЭ эукариот

Поскольку эти элементы широко описаны в отечественной литературе [10, 14], мы приведем лишь самую обобщенную информацию относительно их устройства, факторов, определяющих вероятность и характер их транспозиций, а также роли этих элементов в осуществлении регуляторных процессов клетки и возможности возникновения новых генов. Напомним, что при изучении МГЭ прокариот большую роль сыграло изучение мутантов, у которых поломка в соответствующем гене происходила за счет вставки в этот ген какой-то иной последовательности. В случае же эукариот решающим оказались не только возможности биоинформатики постгеномной эры, но и обнаружение элементов, напоминающих ретровирусы (возможно, из мобильных элементов эукариот и произошли ретровирусы), геномы которых могут встраиваться в клеточный геном. Эти элементы получили название «ретротранспозоны». Они составили класс I транспозонов, характеризующихся тем, что для своего перемещения используют продукт своей транскрипции, который с помощью обратной транскриптазы переписывается в комплементарную ДНК, способную встраиваться в клеточную ДНК. Существуют различные легко узнаваемые варианты ретротранспозонов, относящиеся либо к автономному, либо к неавтономному типу (рис. 4.6, см. вклейку).

Среди автономных элементов есть такие, которые содержат длинные концевые повторы — LTR и очень похожи на эндогенные вирусы. Но есть и такие, достаточно большой протяженности, которые не содержат LTR. Эта группа структур получила название LINES (*long interspersed nuclear elements*), в отличие от малых неавтономных элементов SINES (*short interspersed nuclear elements*). Бросающейся в глаза особенностью LINE и SINE является то, что они относятся к классу высокоповторяющейся ДНК геномов эукариот. Так, одна из наиболее изученных структур в LINE-группе элемент L₁ повторяется в геноме 850 тыс. раз. В группе SINE среди неактивно транспозиционных семейств по-

второв типа MIR и Ther/MIR3 важное место занимает транспозиционно активное семейство Alu-повторов размером примерно 300 п. н., содержащих уникальный сайт, узнаваемый и разрезаемый рестриктазой AluI. Число копий этого элемента достигает 1 млн, а это ~11 % генома человека.

Помимо указанных элементов типа LINE и SINE в геномах многих эукариот обнаружены короткие повторяющиеся последовательности (~400 п. н.), концы которых с обеих сторон от этой последовательности представлены короткими, строго антикомплементами последовательностями (~15 п. н.), т. е. обращенными повторами. В связи с такой особенностью своего строения они получили название MITE (*Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements*) и составляют класс III транспозонов. Число их копий в геномах достигает порядка 100 тыс. (около 6 % емкости генома). На принадлежность этого типа структур к подвижным генетическим элементам указало обнаружение мутаций в некоторых сортах кукурузы и риса, обусловленных вставкой в соответствующие гены MITE-элемента [20].

В результате изучения так называемого гибридного дисгенеза как генной несовместимости между родителями на примере скрещивания между определенными штаммами дрозофилы выявлено различие между ними, касающееся содержания определенного элемента, названного *P*-элементом. Дисгенез обнаруживается тогда, когда в мужском организме этот элемент содержится, а в женском — нет. Изучение структуры *P*-элемента показало, что это — транспозон II класса, снабженный собственной транспозазой, отвечающей за перемещение данного элемента по геному. Оказалось, что в мужском организме ген транспозазы находится в репрессированном состоянии, при привнесении же *P*-элемента в женский организм, не содержащий этот элемент вообще, ген транспозазы в клетках зародышевого пути активируется и вероятность транспозиций *P*-элемента увеличивается. В результате возникает множество мутаций, что и делает потомство такого гибридного скрещивания стерильным [21].

Что несут МГЭ для генома — благо или вред? Возможен двоякий ответ на этот вопрос. Вред — потому, что процесс транспозиций, зависящий от многих как внешних, так и внутренних факторов существования клетки [10], может сопровождаться возникновением генных и хромосомных мутаций. Внедрение МГЭ в ген нарушает его нормальное функционирование (например, при гемофилии А и В, мышечной дистрофии Дюшена и др.). Более то-

го, поскольку гены транспозаз определенных МГЭ обладают собственным промотором для своей экспрессии, то внезапное появление такого по-своему регулируемого промотора в областях генома, не предусмотренных реализующейся программой считывания генов в данное время в данном месте, это — фактор патологии, связанной с нарушением картины активности соответствующих генов. Ясно, что подвижность МГЭ должна быть строго контролируемым процессом. В настоящее время известно, что контрольную функцию выполняет то, как последовательности мобильной ДНК метилированы по 5-му положению молекулы цитозина — 5mC. Также важен в связи с проблемой геной регуляции и так называемый гистоновый код, т.е. зависящий от условий функционирования клетки уровень и характер химических модификаций отдельных аминокислот в молекулах гистонов, определяющих нуклеосомную организацию ДНК и структурирующих генетический материал в виде хроматина.

В последнее время внимание привлекает возможность регуляции процесса транспозиций МГЭ с помощью механизма, основанного на появлении в клетке построенной на комплементарности двуцепочечной РНК различного происхождения, образующейся, например, в результате активности одновременно смыслового и антисмыслового промоторов. Такие молекулы активируют каскад белков, препятствующих (интерферирующих) функционированию тех или иных генов либо за счет уничтожения их мРНК, либо невозможности их трансляции по стерическим причинам. Этот механизм получил название пути интерференционной РНК (RNAi pathway), в которой особо действующим началом являются нарезаемые из RNAi молекулы малой двуцепочечной РНК (~22 п. н.), или так называемой siRNA (*short interfering RNA*) [22, 23]. Далее мы рассмотрим этот механизм подробнее.

Если в процессе эволюции механизм подвижности определенных генетических структур, несмотря на ту опасность, которую он представляет, не элиминировался, то, следовательно, в нем заключена, как на это впервые указала Б. МакКлинтоск [6], какая-то польза, пусть до конца не раскрытая и в настоящее время. Действительно, генетическая емкость генома может и, очевидно, должна увеличиваться за счет не только возрастания объема кодирующих последовательностей, но и возможности возникновения новых комбинаций и новых качеств одного и того же генетического материала.

В таком материале могут возникнуть как новые *цис*-элементы, способные изменить картину регуляции соответствующих генов, так и новые гены. Среди этих комбинаций должна и может возникнуть такая, которая окажется оптимальной в сложившихся условиях функционирования, и это повысит шансы выживания данной биологической структуры. Отсюда следует, что благодаря МГЭ запас прочности жизни увеличивается. Более того, оказалось, что МГЭ — это возможный эффективный инструмент для перестроек генома и предстоит выяснить, как они чувствуют необходимость проведения такой работы, кто из них в каких случаях и к какому результату своей активности стремится. Имеющийся материал в этой области исследований суммирован в книге [10].

Итак, геномы эукариот содержат огромное количество подвижных генетических элементов, составляющих классы I, II и III МГЭ. Существует ли связь между поведением этих элементов и ответом клетки на действие цитотоксического лекарства, направленного на уничтожение клетки?

4.2. О ПОВЕДЕНИИ МГЭ И ВОЗНИКНОВЕНИИ ХЕМОУСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТКИ

Ясно, что конечной целью изучения этой проблемы является возможность демонстрации того, какие транспозоны, когда и как отвечают на появление в клетке какого-то лекарства как стрессового фактора (стрессора) и как активация того или иного транспозона может определить эффективность действия этого лекарства. Первые шаги на этом, скорее всего, долгом пути сделаны. Так, установлено [24], что популяция определенного вида дрозофил, обитающая в странах, в которых интенсивно используются определенные инсектициды, в отличие от такой же популяции, населяющей ближе стоящие к природе страны Африки, выработала устойчивость к этим инсектицидам. Оказалось, что в первом случае в 5'-область одного из генов, кодирующего белок из семейства цитохрома P450, разрушающего в организме многие органические соединения, встроены МГЭ *Dos*. В результате такой вставки экспрессия этого гена значительно повышается и приводит к возникновению фенотипа хемоустойчивости. Более того, получены данные, показывающие, что в случае *Tnt1*-ретротранспозона растений возможна индукция активации промотора этого генетического элемента как в природном хозяине, так

и в гетерологических видах, внедривших этот транспозон. Оказалось, что факторами такой индукции могут выступать различные вещества микробного происхождения (элиситоры, или сигнальные молекулы, вызывающие различные защитные реакции у растений), многочисленные патогенные инфекции, а также раневые повреждения и переохлаждения. Активацию промотора этого транспозона вызывают также салициловая кислота, ионы тяжелых металлов и окислительный стресс. Усиление транскрипции данного транспозона приводило к накоплению в клетке стрессовых белков типа фитоалексинов и активации гена *ELI3*, входящего в системы защиты растения от внешнего воздействия. Важность этих результатов заключается в следующем: они указывают на то, что промоторы МГЭ могут выступать в качестве чувствительных индикаторов условий функционирования клетки и могут быть необходимыми для запуска работы систем защиты клетки [25, 26]. Ясно, что исследования в этой области нуждаются в значительном расширении и детализации.

Роль МГЭ в обеспечении хемоустойчивости клетки выходит на повестку дня в исследовании данной проблемы также в связи с аргументацией идеи Питера Дьюсберга [27—32]. Согласно этой идее множественная лекарственная устойчивость, особенно в случае раковой клетки, обусловлена, прежде всего, сбоями в работе механизма распределения хромосом между дочерними клетками, а также возникновением различий в их геномном содержании. Это приводит к тому, что образующиеся раковые клетки могут содержать неэквивалентные наборы хромосом как по числу, так и по содержанию, а отсюда и неэквивалентность работы генов образовавшихся клеток. Такое явление называется анеуплоидией. МГЭ теоретически могут выступать в качестве анеуплоидогенов (анеугенов) как факторов, вызывающих анеуплоидию. Это обусловлено тем, что они наделены свойством не только возможности перемещений в геноме, но и осуществления эктопической рекомбинации. Этот вид рекомбинации происходит в геноме клетки по сравнительно небольшим участкам гомологии МГЭ, находящимся в разных областях генома на самых различных расстояниях. Участвующие в такой рекомбинации МГЭ способны что-либо в геноме убирать или добавлять, сближать или разъединять связанные между собой части либо менять их ориентацию относительно друг друга, как бы заново перекраивая или перестраивая геном, тем самым определяя его новые качества.

Рис. 4.7 (см. вклейку) демонстрирует картину анеуплоидии, возникающей при раке. Не исключено влияние МГЭ на состояние хромосомных теломер, с дисфункцией которых связано развитие злокачественности (см. обзор [33]). Необходимо установить связь между влиянием МГЭ на функцию теломер и возможностью возникновения анеуплоидии. Роль теломер и больших гетерохроматиновых участков хромосом рассмотрена в обзоре [34]. Кратко остановимся на том, что анеуплоидия как результат возникновения в клетке стрессовой ситуации может определить множественную лекарственную устойчивость и в случае раковых клеток, особенно согласно идее и обоснованиям, представленных в работах Питера Дьюсберга [27—32].

4.3. АНЕУПЛОИДИЯ И МНОЖЕСТВЕННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ ПРИ РАКЕ

Охарактеризуем сжато анеуплоидию как явление. Законы наследственности диктуют строго эквивалентное распределение генетического материала пополам между двумя полюсами (центросомами) делящейся родительской клетки, дающей начало двум дочерним клеткам. Это возможно за счет специальной хромосомной организации генетического материала. Составляющие данный кариотип хромосомы различного размера и морфологии имеют характерную перетяжку (талию), называемую центромерой. К ней присоединяются благодаря образованию специального комплекса белков, называемого кинетохором, микротубулиновые нити соответствующего аппарата деления клетки, получившего название митотического веретена (рис. 4.8, см. вклейку).

Оказалось, что при возникновении определенных генетических ошибок, а отсюда и помех к осуществлению правильности процесса деления, не все хромосомы способны в метафазе митоза одновременно занять положение по экватору в делящейся клетке (это обозначается термином *congression failure*). В таком случае возникают отстающие хромосомы (*lagging chromosome*) и когда формирующаяся перегородка разделит делящуюся клетку на две, то в одной из них окажется больше, а в другой меньше хромосом по сравнению с исходной родительской клеткой. Вот это и есть состояние анеуплоидии на уровне канонического для данного организма числа целых хромосом с вытекающими из этого биологическими последствиями (рис. 4.9, см. вклейку).

Неравномерность распределения хромосом при делении клеток, вызывающая состояние анеуплоидии кариотипа клетки, в настоящее время привлекает внимание как возможный механизм канцерогенеза. Однако в настоящее время авторы относят к анеуплоидии и другой вид генетических отклонений, связанный с возникающими различиями в структуре хромосом [35]. Это касается возможного изменения содержащегося в геноме числа копий того или иного гена. Установлено, что различные части генома у разных особей могут различаться в силу как возможности различных замен отдельных букв генетического кода на другие буквы — *single nucleotide polymorphism* — SNP, так и варьирования числа копий разных генов — *copy number variation* — CNV. Если ошибки в правильности распределения хромосом между дочерними клетками обусловлены нарушениями в аппарате, осуществляющем митоз, то CNV — это результат разрывов, возникающих в ДНК. Они приводят к таким перестройкам генома как выброс, или делеции соответствующих генов, их амплификация (способная увеличивать это число на величину нескольких порядков), а также изменение в размещении генов в геноме или их транслокации. Ясно, что важно изучение факторов, вызывающих анеуплоидию. Что касается разрывов в ДНК, то известны эффекты ионизирующего излучения и действия различных веществ, получивших название кластогенов (*clastogens*). Среди них могут быть и такие, которые способны изменять число хромосом как анеугены, или анеуплоидогены (как факторы, повреждающие аппарат митотического веретена). Предложен даже метод, различающий анеугенное и кластогенное действие вещества на основе его активности стимулировать *in vitro* митоз и образовывать в клетках микроядра, а также и многоядерные клетки [36]. Обширный материал по изучению анеуплоидии представлен в книге [37]. Более новые данные изучения этого явления как результата нестабильности генома рассмотрены в обзоре [38].

В настоящее время установлены различные механизмы возникновения анеуплоидии, характеризующейся либо нерасхождением хромосом, либо их потерей. Это изменение числа центросом, создающего в клетке много полюсов деления, а не два, как положено. Анеуплоидия возникает в результате нарушений функции кинетохора при его взаимодействии с центромерой, нарушений в аппарате расщепления (расхождения) в анафазе митоза двух сцепленных хроматид (установлено, что за это сцепление отвечает специальный белок кохезин, способный к взаимодействию

с ДНК [39]). Более того, возможно, что процесс митоза не достигает своего финала, и тогда образуются тетраплоидные клетки. Такие клетки образуются также в результате нарушений процесса цитокинеза, если в сборке микрофиламентов, определяющих образование перегородки делящейся клетки, появляются дефекты.

Существуют различные методы изучения анеуплоидии: анализ метафазных хромосом и спектральное кариотипирование, изучение характера FISH — *fluorescent in situ hybridization* — окрашивания с помощью специальных флуоресцирующих зондов на основе гибридизации нуклеиновых кислот, что можно проводить непосредственно в интерфазном ядре. В настоящее время возможно использование также многоцветного FISH. Более того, анеуплоидию изучают также с помощью данных сравнительной геномной гибридизации и поведения изучаемого материала при проточной цитофлуориметрии и цитометрии интенсивности окраски структур клетки при их визуализации. Однако один из наиболее удобных методов изучения анеуплоидии — исследование цитогенетических маркеров нарушения целостности хромосом. Таким маркером и служит появление в клетках микроядер. Они могут быть результатом выживания в клетке либо отстающей хромосомы, не достигшей плоскости экватора при делении клетки, либо хромосомного фрагмента, лишённого центромерной области, либо фрагментов, содержащих центромеры. Работу с микроядрами облегчает такой прием, как блокирование цитокинеза, т. е. образования клеточной перегородки в процессе деления клетки с помощью ингибитора полимеризации актина цитохалазина В, не отражающегося на делении ядер так, что клетки становятся двуядерными.

Выявление микроядер дает возможность изучать различные генотоксические эффекты и диагностировать анеуплоидию, однако имеются и недостатки в работе с микроядрами. Так, еще неясно, как долго они могут удерживаться в цитоплазме или происходит их элиминация из клетки. Может ли их ДНК функционировать и как, способны ли они к встраиванию в хромосомы опять по законам гомологической рекомбинации или как-то иначе? Большой интерес представляют микроядра, дающие FISH-сигнал при гибридизации с флуоресцентным зондом, представленным панцентромерной ДНК. Оказалось, что таких сигналов может быть как один, так и несколько. Первый случай отражает нарушение миграции хромосомы, в то время как второй свидетельствует о возникновении множественных центросом. Понять,

почему соответствующая хромосома ядра оказывается в микро-ядре, это значит раскрыть механизмы хромосомной нестабильности, а отсюда и возникающей патологии. Необходимо также понять механизм амплификации центросом, роль различных белков (p53, BRCA1, RAD51 и др.), а также является ли эта амплификация причиной или следствием возникшей злокачественности.

Недавно обнаружено два типа соответствующих молекул клетки, дисфункция которых определяет дефекты протекания митоза [35]. Оказалось, что в полученных линиях мышечных, гетерозиготных по центромерному белку E — *Сenp-e*, каждое деление клеток сопровождается либо утратой, либо приобретением лишней хромосомы. Такая молекула относится к классу моторных белков и участвует в размещении хромосом на веретене. Если этого белка нет вообще, то организм нежизнеспособен, если в гетерозиготном состоянии неактивна лишь одна аллель гена этого белка, то наблюдаются сбои в распределении правильного числа хромосом. Более того, этот белок причастен к осуществлению контроля над состоянием веретена (*spindle checkpoint* [40]). Таким образом, дисфункция этого белка не только вносит хаос в распределение хромосом, но и позволяет дефектным клеткам завершить процесс деления, протекающий с большими нарушениями. Ясно, что в таком случае и должна возникать хромосомная нестабильность, при которой могут активироваться как гены, стимулирующие опухолевый рост, так и гены, осуществляющие программу смерти клетки — апоптоз.

Другой важной молекулой для правильного протекания митоза является белок Mad2, также контролирующий веретено. Активность его на начальных стадиях цикла подавляется онко-супрессором Rb, так же, как и такие гены, которые активируются с помощью E2F-семейства транскрипционных факторов. Перед наступлением S-фазы синтеза ДНК в клетке белок Rb, функция которого важна для осуществления клеточного цикла (см. гл. 6), инактивируется и белки E2F могут активировать экспрессию своих мишеней, среди которых и ген белка Mad2. Увеличение синтеза этого белка блокирует продвижение митоза, который может начаться лишь после окончания S-фазы. Таким образом, инактивируя Rb, можно создать в клетке ситуацию высокого содержания Mad2, обуславливающего возникновение анеуплоидии. Действительно, содержание Mad2 и уровни анеуплоидии в раковых клетках высоки. Так что же является причиной злокаче-

ственности клетки — хромосомный хаос или утрата функции онкосупрессора? Изучение эффектов Mad2 показало, что при его высоких концентрациях нарушается расхождение хроматид и высока вероятность образования анеуплоидии, возникающей на уровне как возможной перестройки хромосом, так и изменения их числа. Это особенно важно, если учесть, что чаще всего рак выявляется на основе тетраплоидных клеток. Тетраплоидность, по-видимому, также облегчает возникновение мутационных изменений либо в онкогенах, либо в генах апоптозного пути. По какому сценарию будут развиваться события в клетке, направленные либо на стимуляцию клеточной пролиферации, либо на устранение клетки из организма поможет установить изучение представительной коллекции анеуплоидных штаммов дрожжей, полученной в лаборатории Angelika Amon [39]. В этой же лаборатории установлено, что специальная киназа CDC5, похожая на ту киназу (*Polo*), которая активируется в раковой клетке, важна для правильной ориентации сестринских кинетохор, предотвращая возможность возникновения анеуплоидии.

Более того, в последнее время нарастает интерес к установлению связи между работой механизмов, обеспечивающих апикально-базальную ориентацию или полярность клетки, характером нарушений в их работе и возникновением злокачественного роста [40]. В миллиардном содружестве клеток организма одна часть клетки всегда должна смотреть наружу (апикальная мембрана), другая — внутрь (базальная мембрана), клетки соединяются между собой посредством специальной структуры — апикально-соединительного комплекса — АЈС. Идентифицированы белки и их комплексы, отвечающие за правильную ориентацию сборки клеточных структур, и открывается возможность изучения влияния работы этих механизмов на возникновение анеуплоидии.

Итак, анеуплоидия как конечный результат одного из видов стрессового ответа клетки требует дальнейшего углубленного изучения, в рамках же настоящей книги интерес к этому явлению заключается в том, что согласно идее, аргументированной Duesberg P [27—32], анеуплоидия — это главный фактор возникновения МЛУ раковой клетки, не поддающейся химиотерапии. Рассмотрим, какова же эта аргументация.

Прежде всего, бросается в глаза удивительная прямая корреляция между быстрым возникновением изменений в формуле кариотипа злокачественной клетки, изменением ее морфологии

и появлением МЛУ. Она наблюдается и в том случае, когда из генома делетированы гены всех МЛУ экспортеров. МЛУ при раке либо возникает очень быстро в результате применения антираковых средств, либо вообще присуща больным, даже не получавшим никакой химиотерапии. Чем сильнее кариотипические изменения и более выражена анеуплоидия, тем явственнее эффекты МЛУ (см. рис. 4.6), хотя нормальные диплоидные здоровые клетки, несмотря на возможность активации в организме различных мутационных механизмов, а также процессов эпигенетических изменений, по-прежнему остаются чувствительными к действию лекарства. Скорость возникновения МЛУ при раке находила объяснение в рамках понятия о возникновении гена-мутатора. Но если при действии гена-мутатора возникающая МЛУ должна быть явлением необратимым, то при возможности компенсаторных изменений хромосом в раковой клетке наблюдается возвращение фенотипа чувствительности [41]. Таким образом, не только нарушения в специальных «генах резистентности» (отвечающих за транспорт лекарства, регуляцию поврежденных в ДНК, апоптоз, передачу сигналов), но и изменения на уровне характеристик тотального генетического материала клетки приводят к возникновению МЛУ. Дьюсберг постулировал, что в основе этого биологического эффекта лежат изменения в качестве и количестве образующихся транскриптом, которые определяют многочисленные фенотипические признаки клетки. Активация таких транскриптом при раке происходит, очевидно, подобно тому, как известно для синдрома Дауна при трисомии по 21-й хромосоме [28]. То, что экспрессия «генов резистентности» регулируется и зависит от активности многих метаболических путей, а также характера размещения продуктов этих генов в клетке, показано в работе [42].

Удивительно, но возникновение фенотипа МЛУ при раке, связанное с незапрограммированными перестройками генома и изменениями в характере транскриптов в клетке, напоминает такое встречающееся в природе явление, как образование биопленок из свободно живущих отдельных клеток бактерий и грибов [43]. Клетки, образующие биопленки, претерпевают сложные изменения в реализации транскрипционных программ и индукции новых морфологических характеристик, синтезе экстрацеллюлярного матрикса и характере межклеточных коммуникаций. Построенная из чувствительных к действию лекарства клеток биопленка обладает фенотипом МЛУ, возможно, исполь-

зую те же принципы реорганизации своих потенций, которые используются и клетками опухоли.

Итак, рассмотренный материал указывает на то, что в ответе клетки на действие цитотоксического лекарства важно не только то, в каком состоянии находятся те группы генов, которые непосредственно определяют фенотип чувствительности, но и геном клетки в целом. В связи с этим важны состояние МГЭ, возможность встречи клетки с анеугенами (анеуплоидогенами), а также нарушений в работе механизмов, определяющих полярность клетки, или ее организации правильной ориентации (ниже мы коснемся этого вопроса).

Итак, принцип организации клеточных геномов с использованием не только жестко закрепленных мест соответствующих генов, но и определенных подвижных элементов, способных к перемещениям в геноме, что влияет на активность новых соседей и обуславливает вероятность возникновения хемоустойчивости. Примеры таких исследований доказывают, что за счет перемещения в геноме МГЭ возможна защита клетки от токсикантов, хотя такие примеры немногочисленны. Однако МГЭ — это также фактор анеуплоидий, делающих клетку за счет хаоса в кариотипе невосприимчивой к ряду воздействий, включая химиотерапевтические средства. Следовательно, свойство пластичности, присущее геному, необходимо во избежание патологий держать под контролем, определяя грань перехода пластичности в нестабильность генома, и эта задача ждет своего решения. Проблема этой проблемы необозримо, но, очевидно, даже первой борозды еще не сделано.

Связано ли поступление лекарства в клетку с возникновением и передачей специальных сигналов, что предоставляло бы клетке возможность получения информации об условиях своего функционирования и разворачивания средств, отражающих тот или иной удар, наносимый извне. Рассмотрению этого материала посвящена следующая глава.

**ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВА
И ЗАЩИТНЫЙ ОТВЕТ КЛЕТКИ НА СТРЕСС:
II. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИГНАЛЫ
И ХЕМОУСТОЙЧИВОСТЬ**

**5.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПУТЯХ ПЕРЕДАЧИ
СИГНАЛОВ В КЛЕТКЕ**

Жизнь всех организмов на Земле определяется их взаимодействием с внешней средой существования, которое в самой значительной степени осуществляется с помощью малых молекул [1—3]. Они обеспечивают питание клетки, ее коммуникативную способность, готовность систем клетки к анализу информации о сложившихся условиях функционирования и принятии соответствующих решений. Однако клетка, предназначенная для поступления различных малых молекул, может воспринять и такую молекулу, которая окажется токсичной для ее метаболизма. Какова может быть реакция клетки в этом случае? Оказывается, решение клеткой задач по восприятию угрозы существованию и принятию мер для отражения ударов возможно, так как она наделена способностью узнавать, понимать и реагировать на соответствующие возникающие сигналы, представленные теми или иными молекулами клетки и их различными формами. Эта область знаний, особо интенсивно изучаемая в настоящее время, получила в биологии название передачи сигнала (*signal transduction*). В изучении путей и механизмов передачи сигнала решающую роль сыграло раннее наблюдение связи между восприятием внешнего сигнала и сопровождающимися изменениями в клетке концентраций таких молекул, как ГТФ, а также двух групп — больших и малых — белков, регулируемых с помощью ГТФ (*GTP-binding proteins*, или G-белков). Установлено, что комплекс рецептора с лигандом, представленным гормоном адреналином, лишен способности непосредственно активировать аденилатциклазу, производящую вторичный мессенджер циклическую сАМР, но привлекает к выполнению такой функции молекулу G-белка. Эти данные легли в основу представления о появлении в клетке химического сигнала и активации путей его передачи, вплоть до проявления конечного результата в виде со-

ответствующего поведения клетки в тех или иных условиях функционирования. Концептуальное и экспериментальное изучение этой области отмечено Нобелевской премией, присужденной М. Rodbell и А. Gilman в 1994 г. Общая информация о достижениях в этой области исследований представлена в Gomperts, BD.; Kramer, IM. Tatham, PER. (2002). Signal transduction. Academic Press. Здесь же кратко отметим следующее.

Для того чтобы началась передача сигнала должно произойти связывание между двумя типами молекул. Один тип представлен молекулами белков, функционирующими как многочисленные клеточные трансмембранные рецепторы, способные улавливать тот или иной сигнал. Они располагаются либо на поверхности клетки, либо по всей ее толще (внутриклеточные рецепторы, лиганды для которых, или первичные мессенджеры — стероидные гормоны, тиреоидный гормон, ретиноевая кислота, производные витамина D₃ — в отличие от внешнего сигнала должны пройти через цитоплазматическую мембрану). Другой тип молекул — это сам сигнал, или первичные мессенджеры, молекулы-лиганды, связываемые рецепторами и представленные либо различными малыми молекулами, либо различными сигнальными молекулами клетки. (К сигнальным молекулам относятся гормоны, факторы роста, компоненты экстрацеллюлярного матрикса, нейротрансмиттеры.) Связь рецептор—лиганд приводит к активации рецептора, выражающейся в изменении конформации его молекулы. В результате либо индуцируется энзиматическая активность рецептора, либо возникают сайты, способные узнавать и связывать в отличие от неактивного рецептора иные молекулы. Такова основа принципа организации пути передачи сигналов, образующего сложные сети. На этом пути для достижения необходимой в биологии высокой степени разнообразия используются самые разные элементы. Например, белки-переключатели (GTP-binding proteins), а также специальные ферменты — протеинкиназы. Они придают соответствующим белковым молекулам новые свойства за счет их модификаций с помощью химических групп (пост-трансляционная модификация). Другая группа ферментов удаляет эти модификации и возвращает модифицированные белки в исходное состояние. Более того, активация рецепторов обуславливает появление в клетке так называемых вторичных мессенджеров, синтезируемых различными ферментами, чувствующими состояние рецепторов, т. е. эффекторов рецепторов, способных функционировать при активации рецептора и которые в свою очередь активируют многие ферменты, образуя

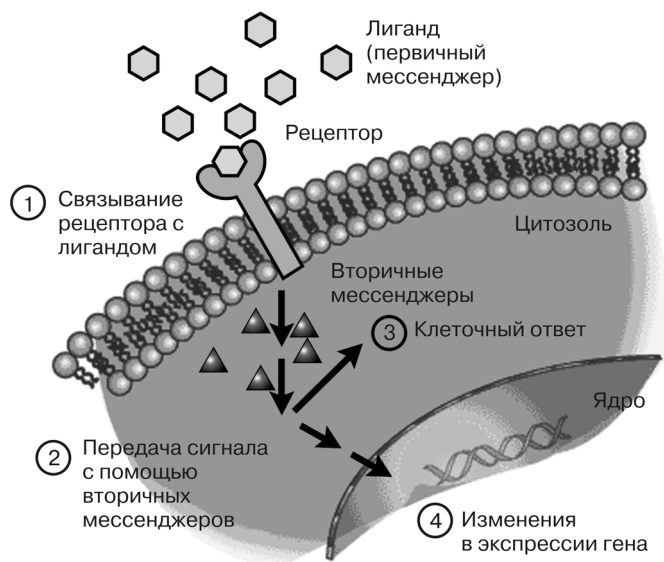


Рис. 5.1. Схема пути передачи сигнала от лиганда (первичного мессенджера) через рецептор, образование вторичных мессенджеров, вызывающих клеточный ответ и изменение в экспрессии генов

каскады в передаче сигнала. В качестве таких мессенджеров известны циклические нуклеотиды, производные компонента мембраны фосфатидилинозитола — фосфатидилинозитол-ди- и трифосфат (PIP₂ и PIP₃), инозитол-трифосфат (IP₃), диацилглицерол (DAG) (рис. 5.1).

Если по каким-либо причинам непосредственная связь молекул, передающих сигнал, затруднена, природа пошла по пути использования молекул адаптерных белков, облегчающих необходимые партнерские взаимодействия. В качестве адаптерных белков часто выступают белки, составляющие остов клетки — скеффолд — *scaffold*.

Как активируются и дезактивируются молекулы, переносящие сигнал? Этот вопрос важен в связи с необходимостью соблюдения в клетке состояния гомеостаза и, следовательно, активация и деактивация пути передачи сигнала должны быть строго регулируемы. Это достигается за счет работы специальных ферментов, представленных двумя группами: одни специфически модифицируют в свое время в своем месте соответствующие молекулы, либо наделяя их свойством инертности, либо активируют их, другие белки также

координировано устраняют эти модификации, активируя или инактивируя модифицированные молекулы. Так в системе можно запускать какой-либо процесс и возвращать ее в исходное состояние. К первой группе относятся протеинкиназы, предназначенные для переноса соответствующих химических групп от различных молекул к молекулам белков. Установлено большое число — 518—838 [4,5] киназ, составляющих кином клетки. В клетках эукариот наиболее интенсивно работают киназы, фосфорилирующие определенные белки с помощью переноса фосфатной группы из γ -положения в высокоэнергетической молекуле АТФ на гидроксильную группу аминокислотных остатков белков. К таким белкам относятся Ser/Thr- и Tyr-киназы. Фосфорилированные белки в зависимости от того или иного биохимического пути могут либо активироваться либо, напротив, инактивироваться, прекращая распространение сигнала. К другой группе ферментов относятся фосфатазы, узнающие фосфорилированные белки и удаляющие из них фосфатные группы. В результате белок утрачивает свойства, наведенные с помощью фосфорилирования, и изменяет свои свойства.

Что касается прокариот, то системы передачи сигнала у них необходимы в основном для того, чтобы информировать клетку о внешних условиях ее жизни. Для этого используется двухкомпонентная система регуляции активности генов. Один компонент этой системы представлен связанной с мембраной клетки особой киназой — гистидиновой, способной модифицировать саму себя за счет фосфорилирования в своей молекуле лишь остатка гистидина. Состояние этой киназы изменяется в зависимости от внешних условий жизни клетки. При этом она связана с молекулой специального белка-регулятора, отвечающего на изменения в гистидиновой киназе так, что экспрессия тех или иных генов становится возможной. Передача сигнала состоит в том, что при отклонениях от нормальных условий гистидиновая киназа автофосфорилируется, присоединяя фосфатную группу от АТФ к соответствующему остатку His. Затем эта же киназа переносит фосфатную группу к аспарагиновому остатку белка-регулятора, что активирует его, и тогда экспрессия многих генов в бактериальной клетке становится возможной.

Киназы имеют выраженную специфичность, фосфорилируя, как уже указывалось, либо серин-треониновые, либо тирозиновые остатки. Изучены свойства и функциональное предназначение многих серин-треониновых и тирозиновых киназ. Оказалось, что тирозиновые киназы делятся на две группы: одни из них сами являются рецепторами, связывающими такие молекулы, как эпидермальный и тромбоцитарный факторы роста клеток, другие —

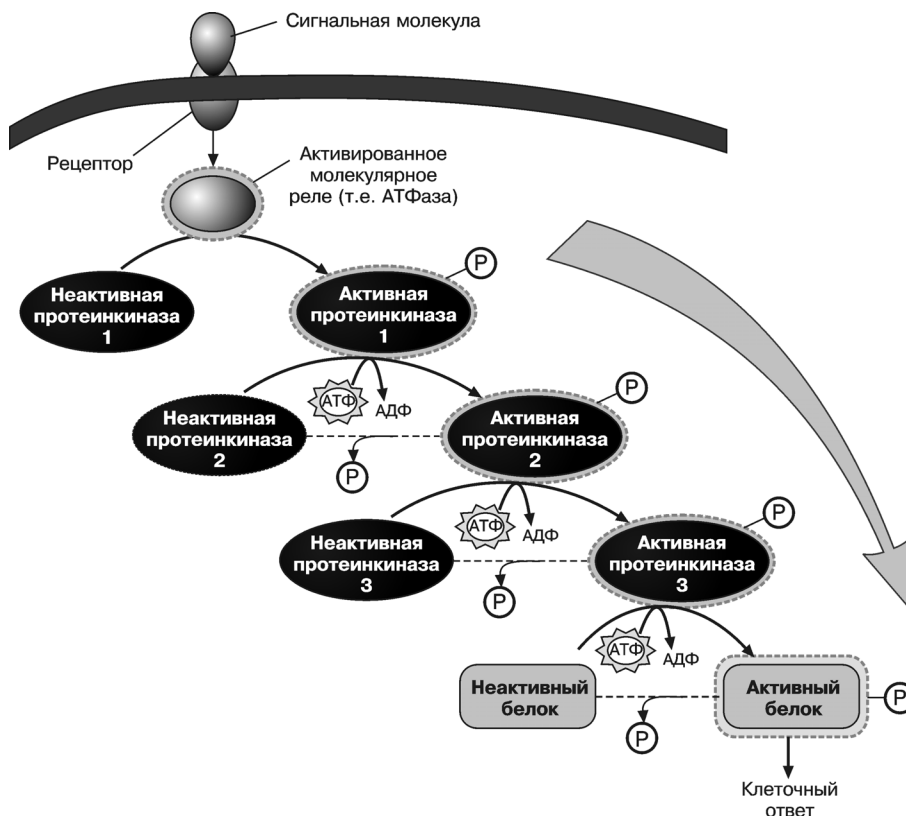


Рис. 5.2. Схема каскадного механизма передачи сигнала от сигнальной молекулы через рецептор, активирование молекулярного реле, представленного ГТФазами, и активации за счет фосфорилирования протеинкиназ, образующих последовательную цепь в передаче сигнала вплоть до проявления клеткой соответствующего ответа

рецептор-ассоциированные молекулы, которые привлекаются к рецептору после того, как он связался с лигандом. Этим ферментам присуща особая регуляция. Их активация связана с определенным рядом условий, например с образованием гомо- или гетеродимера молекулы данного фермента.

Итак, в организации передачи сигнала выделяют три элемента: сигнал, рецептор и представительный ряд молекул, образующих каскад молекулярных взаимодействий на этом пути, конечная цель которого состоит в том, чтобы определить то или иное поведение клетки (рис. 5.2).

При взаимодействии с внешней средой большое значение имеют трансмембранные рецепторы, расположенные на поверхности клетки. Ясно, что их число должно быть велико. Кратко охарактеризуем эти рецепторы.

5.2. РЕЦЕПТОРЫ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ В ПЕРЕДАЧЕ СИГНАЛА

В настоящее время наиболее изучены такие их типы: рецепторы, связанные с G-белками — GPCRs (*G-protein-coupled receptors*); рецепторы факторов роста, представленные тирозиновыми киназами; белки, названные интегринами, которые ответственны за контакт между клетками; особые TLR-белки, или *Toll-like receptors* (названные так из-за схожести на одну из молекул дрожифилы), а также специальные белки, образующие в клетке ионные каналы. На рис. 5.3 показана упрощенная схема передачи сигналов от различных рецепторов.

Что касается рецепторов, связанных с G-белками, то отличительной чертой их строения является наличие сегментов, пересекающих мембрану 7 раз и физическая связь с G-белками, способными связывать молекулы ГТФ. В неактивном состоянии они находятся в клетке в виде тримеров — комплексов, состоящих из различных α -, β - и γ -субъединиц. Как только образовалась связь между лигандом и рецептором и последний изменил свою конформацию, субъединица α связывает молекулу ГТФ и отсоединяется от комплекса остальных двух субъединиц так, что освобождаются места для связывания с другими молекулами пути передачи сигнала. Так начинается распространение сигнала в клетке, вовлекающего в этот процесс до 2000 различных внутриклеточных молекул. Длительность сигнала должна иметь значение. От чего она зависит? От стабильности комплекса рецептор—лиганд, определяющей время его жизни, от количества в клетке молекул белков-эффекторов и времени жизни комплексов с ними. Более того, важна скорость деактивации рецептора за счет либо фосфорилирования, либо «упрятивания» его в клетке (интернализации), а также скорость деактивации эффекторных молекул за счет усиления той ГТФазной активности, которая присуща малым (Ras-, Rho- и Ral-семействам) и большим G-белкам. Таким образом, группы G-белков способны определить длительность возникшего сигнала, тем более что в клетке обнаружены белки GAPS (*GTPase-activating proteins*), стимулирующие

щие ГТФазную активность. Исключительная важность рецепторов этого типа состоит в том, что они воспринимают такие необходимые в управлении всем хозяйством организма молекулы, как секретируемые клетками специальные небольшие белки хемокины, важные для деления клеток и их перемещений по организму. Следовательно, контроль состояния этих рецепторов при раке важен в терапии злокачественных заболеваний.

Такие рецепторы, как тирозиновые киназы (РТК), имеющие связывающий лиганды экстрацеллюлярный домен и внутриклеточный домен, обладающий киназной активностью, образуют различные семейства в зависимости от строения рецептора и структуры узнаваемых лиганд. Общим есть то, что в цитоплазматической мембране рецептор должен находиться в форме димера, структура которого стабилизируется при связывании лиганда. При этом сближение двух цитоплазматических доменов обуславливает аутофосфорилирование их тирозиновых остатков, что приводит к изменению конформации и активации киназного домена. В результате этого фосфорилируются последующие группы внутриклеточных молекул, что и составляет путь передачи соответствующего сигнала. Оказалось, что РТК также связаны с работой малых G-белков, которые своими С-концами прикреплены к мембранам и, активируясь под действием РТК, привлекают соответствующие белки в соответствующие мембранные области, важные на пути передачи сигнала. Более того, активация малых G-белков с помощью РТК приводит к активации специального класса белков, называемых фактором обмена гуанинового нуклеотида (*Guanine Nucleotide Exchange Factors* — GEF). При активации GEF активируется большое количество малых G-белков, и это приводит к резкому усилению возникшего сигнала. Если в РТК возникают повреждения, нарушающие регуляцию работы фермента, то его постоянная активность позволяет проводить аналогию между ролью работы этого фермента и онкогеном.

На важность этого класса киназ указывает не только то, что они охватывают семейство не менее чем из 50 членов, но и то, что существуют тирозиновые киназы, сами не являющиеся рецепторами, но тесно с ними связанные. Таковы Янус-киназы — JAKs, важные в ответе клетки на цитокины и факторы роста и активирующиеся при связывании лиганда с рецептором. Фосфорилирование тирозинов рецептора открывает возможность его взаимодействий с нижележащими звеньями цепи передачи сигнала, представленными специальными белками STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (рис. 5.3).

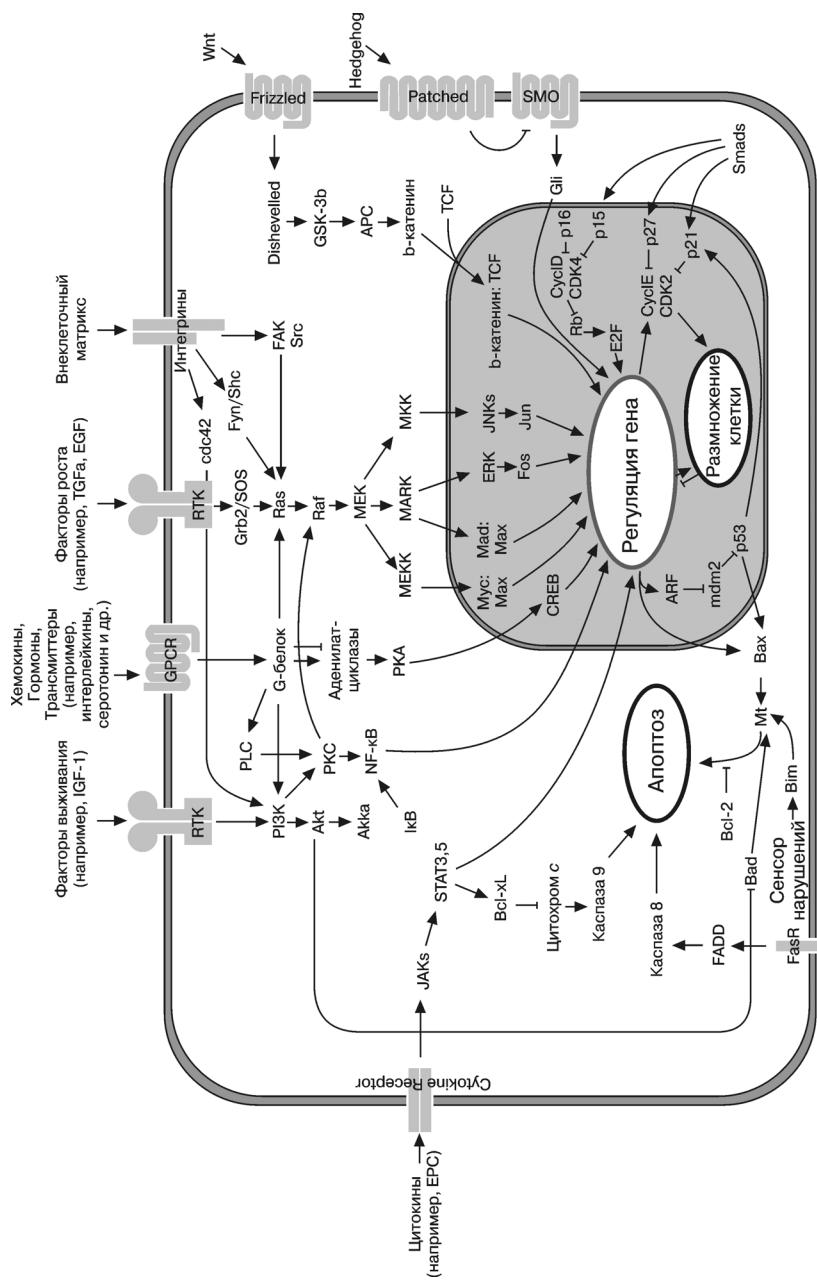


Рис. 5.3. Схема передачи сигналов от различных рецепторов клетки (Hannahan D., Weinberg R.A. The Hallmarks of Cancer // Cell. — 2000. — 100, Jan. 7. — P. 57—70)

Следующая группа важных рецепторов клетки — интегрины. Само название этих белков указывает на важность их участия в многоклеточном организме в сфере межклеточных взаимодействий и взаимодействий с внеклеточным матриксом, основными компонентами которого являются фибронектин, коллаген и ламинин. Изменение конформации интегринов при взаимодействии с лигандом индуцирует активность специальных киназ (PLK, FAK, talin, paxillin, киназы семейства Src, ГТФазы семейства Rho, p130Cas) и запускается путь передачи сигнала вплоть до формирования соответствующего ответа клетки. Ясно, что интегрины свободноживущих клеток, таких, как элементы крови, должны быть в неактивной форме, в отличие от клеток, образующих ткани.

Наконец коснемся такого класса трансмембранных поверхностных рецепторов, как *Toll-like receptors* — TLRs. Они названы так потому, что представлены белками, ген которых очень похож на ген, идентифицированный в геноме дрозофилы. Эти белки пересекают цитоплазматическую мембрану единожды и при своем функционировании используют несколько адаптерных белков. С их помощью устанавливается связь с целым рядом киназ (IRAK1, IRAK4, TBK1, IKK α) и под действием сигналов, передающихся по этому пути, изменяется картина активности очень многих генов. TLRs-рецепторы особенно активно функционируют в иммунной системе организмов.

Одна группа белков — это рецепторы ионов, которые в неактивном состоянии представляют собой замкнутую систему (*ligand-gated channels*), при связывании же иона конформация молекулы изменяется так, что в ней появляется проход, по которому ион проходит в клетку в соответствии с ее потребностями. Скорость работы этих каналов составляет миллисекунды.

5.2.1. Внутриклеточные рецепторы в передаче сигнала

Что касается внутриклеточных рецепторов, то они представлены растворимыми белками (ядерные рецепторы), функционирующими либо в нуклеоплазме, либо в цитоплазме. Очевидно, что ядерные рецепторы — это то важное звено, которое отвечает за привлечение генома к контролю над ситуациями, возникающими в клетке. Лиганды для таких рецепторов должны поступить внутрь клетки различными путями, включая обычную пассивную диффузию. Первыми были изучены такие лиганды ядер-

ных рецепторов, как липофильные гормоны (стероиды), а также различные производные витаминов А и D. Оказалось, что связывание лиганда с предсуществующим апорецептором позволяет последнему проявлять свойства транскрипционного фактора благодаря наличию в комплексе шаперона (HSP90), создающего нужную для этого свойства укладку данного апорецептора. В изменившемся виде он способен узнавать в геномной ДНК соответствующие последовательности, получившие название HREs — *Hormone-Responsive Elements*. Они располагаются, как правило, в областях промоторов соответствующих генов и связывание комплекса лиганд—рецептор с этими элементами активирует транскрипцию этих генов.

Ядерные рецепторы имеют характерную структуру с четкой доменной организацией, предназначенной для выполнения функций связывания как с ДНК (N-концевой ДНК-связывающий домен), так и с лигандом (С-концевой лигандсвязывающий домен), а также элементов структуры, облегчающих выполнение этих функций (за счет, например, способности молекулы к гомодимеризации). Ядерные рецепторы, узнающие стероидные гормоны (более 45 адренальных стероидов), дюжину половых гормонов — андрогены, эстрогены, прогестены, 25—30 видов метаболитов витамина D, возможно, сотни жирных аминокислот, эйкозаноиды, гидрожиры и биоактивные липиды, отвечая за устранение таких лигандов в организме, играют ключевую роль в поддержании гомеостаза в тканях. Помимо рецепторов этого типа обнаружены нестероидные ядерные рецепторы, акцептирующие такие молекулы, как тиротриптин, витамин D₃ и некоторые другие лиганды. Эти молекулы обязательно образуют гетеродимеры с ядерным рецептором RXR, который связывает ретиноевую кислоту — одну из форм жизненно важного витамина А. (Отметим, что при изучении этого типа рецепторов внимание привлекают также такие молекулы крови и тканей организма, как липокаллины [6]. Связь между судьбой многих молекул в организме и состоянием липокалинов может оказаться важной.) Кроме того, в клетках выявляются молекулы, устроенные точно так же, как и ядерные рецепторы, но поскольку их лиганды не были установлены, они были названы сиротскими ядерными рецепторами (*orphan nuclear receptors*). Среди них обнаружены рецепторы PXR и CAR, с активностью которых связана судьба лекарства в клетке. Охарактеризуем эти молекулы подробнее.

5.2.2. Внутриклеточные сиротские ядерные рецепторы PXR, CAR и метаболизм лекарства

Метаболизм лекарства — это тема, изучаемая в течение длительного времени. Используя различные модели высших организмов, удалось установить, что химическое соединение, поступающее в клетку, подвергается соответствующей обработке со стороны специальных молекулярных систем, ответственных за процессы химических превращений различных малых молекул в клетке. Эти системы делятся на две группы, называемые фазами I и II. Фазу I химических превращений составляют специальные гемсодержащие монооксидазы, представленные цитохромом P450, или CYP. В настоящее время известно, что геном человека кодирует 57 CYP-белков [7]. Их задача заключается в том, чтобы расщепить молекулярный кислород и вставить один из его атомов в молекулу соответствующего лекарства, что повышает полярность и реактивность такого химического продукта. Другой атом молекулы кислорода восстанавливается до молекулы воды. Окисленное лекарство становится субстратом ферментов фазы II, задача которых состоит в том, чтобы конъюгировать полученную химическую молекулу с соответствующими эндогенными гидрофильными молекулами (например, глутатионом). Это еще более повышает полярность соединения и его водорастворимость. В результате такой обработки выброс соединения из клетки в желчь и/или мочу облегчается.

Ясно, что клетка не должна испытывать потребности в перманентной активности генов фаз I и II, и эти гены должны работать только тогда, когда в клетку проникают химические соединения. Таким образом, на пути, определяющем эффективность действия лекарства, важны активности двух групп генов: тех, которые кодируют переносчики лекарств, и тех, которые кодируют ферменты их метаболизма. Оказалось, что к регуляции активности этих генов причастны сиротские ядерные рецепторы. Они охарактеризованы в обзоре [7, 51], здесь же отметим следующее.

При работе с X-рецептором грызунов, отвечающим на стероидный прегнан (*pregnane*) и разные производные этой молекулы, была установлена индукция гена *CYP3A*, важного при метаболизме ксенобиотиков. Этот рецептор был назван PXR. Изучение еще одного сиротского ядерного рецептора, активирующегося под действием стероидного андростена и ген которого экспресси-

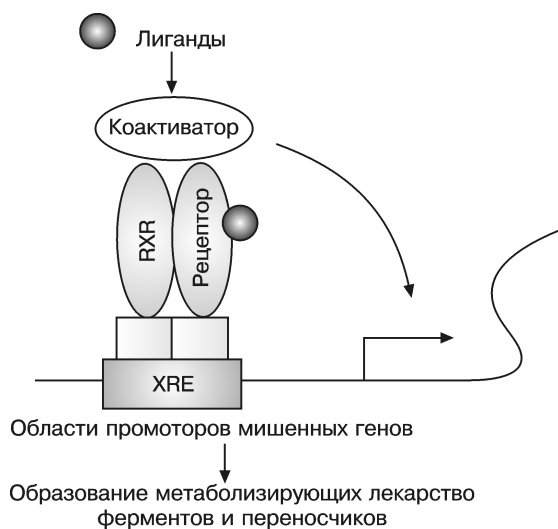


Рис. 5.4. Регуляция экспрессии метаболизирующих лекарство ферментов и их переносчиков с помощью лиганд-рецепторных взаимодействий и узнавания ими соответствующих XRE-элементов генома [7]

руется конститутивно — CAR-рецептора, показало в случае его активации возможность индукции гена *CYP2B*, также важного для метаболизма определенных ксенобиотиков. Установлено, что рецепторы PXR и CAR прежде всего образуют гетеродимеры с рецептором ретиноевой кислоты (рис. 5.4).

Такой гетеродимер способен узнать в геноме специальную структуру — элемент, отвечающий на ксенобиотик (*xenobiotic response element* — XRE), и связаться с ней. Этот элемент локализуется в промоторных областях мишеных генов, которыми являются гены фаз I и II детоксикации и гены таких переносчиков, как *MDR1*, *MDR2*, *MRP2* и *OATP2*, и связывание с XRE обеспечивает транскрипцию этих генов.

Оказалось, что эти рецепторы способны к «переговорам» (*crosstalk*), так как PXR может регулировать активность *CYP2B*, а CAR — активность *CYP3A*. Интересным оказалось такое свойство этих рецепторов, что у разных видов они узнают различный спектр ксенобиотиков. Для изучения у человека особенностей регуляции мишеных генов, обладающих XRE, была специально получена «очеловеченная» линия мышей, трансгенных в отношении рецепторов PXR и CAR. Помимо обнаруженных рецепторов идет поиск и возможных других молекул-рецепторов, способных влиять на судьбу в клетке применяемого лекарства. Интерес вызывает также изучение в течение длительного времени такой молекулы, как рецептор диоксина — арилгидрокарбон-

вый рецептор — AhR. Только ли ксенобиотики узнают этот рецептор, отвечая за вызываемую ими токсичность, или он выполняет какую-то функцию и в нормальной физиологии клетки? Этому рецептору посвящен специальный обзор [8]. Здесь же отметим следующее. Белок относится к семейству белков bHLH (*basic helix-loop-helix*), регулирующих ряд процессов (циркадные ритмы, нормальное развитие органов, нейрогенез, нормальный метаболизм и стрессовый ответ клетки на гипоксию). Безлигандный белок находится в цитозоле в комплексе с участием шаперона HSP90, при связывании же с лигандом он перемещается в ядро, образуя гетеродимер со своим специальным ядерным переносчиком. Вот этот гетеродимер обладает способностью узнавать и связываться с XRE-элементами промоторов соответствующих генов, в том числе с геном цитохрома P450, осуществляющего детоксикацию химических соединений. После активации транскрипции генов, промоторы которых содержат XRE-элемент, AhR возвращается в цитозоль и подвергается деградации. В настоящее время усилия исследователей сосредоточены на установлении функции этого рецептора в нормальной и злокачественной клетках, не подвергающихся действию ксенобиотика [8].

Итак, обнаружение таких рецепторов, которые могут выступать в качестве сенсоров ксенобиотиков, поднимает вопрос о возможности контроля над ними в процессе химиотерапии. Однако решение указанной задачи осложнено тем, что эти рецепторы важны также для установления возможных уровней содержания в организме различных эндобиотиков, например билирубина (продукта разложения гемсодержащих белков) в крови, а также желчных кислот и их детоксикации.

5.3. ОБ АКТИВИРОВАНИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ОТВЕТЕ КЛЕТКИ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС

Систематическое изучение клеточного ответа на стресс началось с обнаружения того факта, что при действии на клетку высоких температур резко усиливается активность соответствующих генов, чем под действием специального транскрипционного фактора HSF (*heat shock transcriptional factor*). Спустя несколько часов после температурного воздействия в клетке накапливаются специальные белки, получившие название белков теплового шока (*heat shock proteins* — HSP). Они относятся к классу стрессо-

вых белков. Оказалось, что первоначально обнаруженная функциональная роль этих белков состоит в том, что они способны предотвращать беспорядочное слипание деформированных белковых молекул и восстанавливать правильную укладку обслуживаемых ими белков-клиентов, структура которых в результате действия температурного стресса нарушается, приводя к их необратимой агрегации [9]. Джон Эллис (J. Ellis) предложил для этих обслуживающих белков название «шапероны» как белков, предназначенных для сопровождений и ответственности за структурную безопасность соответствующих функционирующих в клетке белков-клиентов. Те белки, которые непосредственно осуществляют укладку молекул, называются шаперонинами.

Установлено, что различные шапероны синтезируются в клетке не только при температурном воздействии, но и при самых разных видах стресса. Важнейшим свойством HSP-белков оказалась их способность даже на базальном уровне наличия в клетке активировать в течение минут основные пути передачи сигнала. Они связаны с активацией в первую очередь киназ, которые получили название MAPK (*mitogen-activated protein-kinases*). На действие белков теплового шока отвечают три основные MAPK-киназы — ERK, JNK и p38, а также киназа B (PKB/Akt) [10]. Отметим здесь выполняемую в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины работу по изучению киназы SK6, относящейся к подсемейству RSK MAPK-активируемых киназ [11]. Эти ферменты — необходимое звено, связывающее действие внешнего фактора с внутриклеточным ответом [12—14]. Отметим также, что при изучении молекулярного ответа клетки на действие различных стрессовых факторов в случае такого объекта показана активация протеинкиназы C1 (PKC1) [15]. Данные изучения сигнальных путей, активирующихся в клетках грибов в стрессовых условиях действия лекарства, суммированы в обзоре [16].

Что касается MAPK-киназ, то в настоящее время принято их деление на MAPK-семейство и на семейство киназ, активируемых с помощью MAPK-киназ — МК-семейство [10]. В MAPK-семейство входит 5 групп ферментов, активируемых как факторами роста и другими сигнальными молекулами, так и различными факторами стресса: ERK1 и 2, c-Jun (JNK1,2,3), p38 (различные изоформы), ERK3,4 и ERK5. При имеющихся ярких различиях общим для всех них является то, что они представляют эволюционно закрепленный набор последовательно действующий

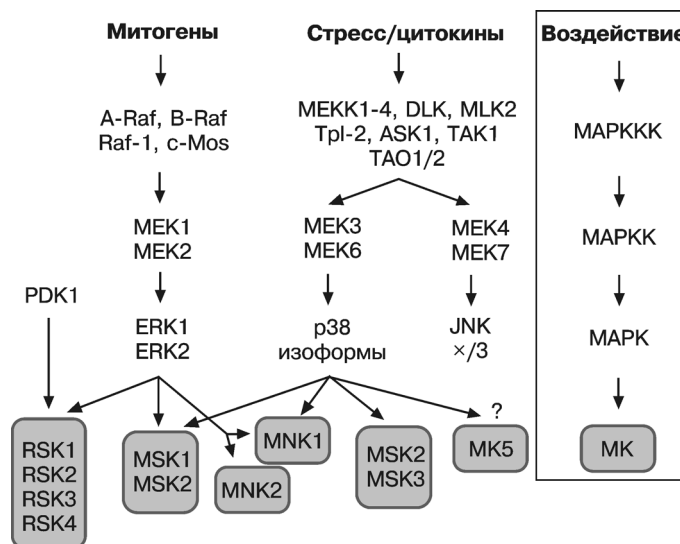


Рис. 5.5. Схема взаимосвязи основных путей передачи различных сигналов и участия в них изученных ключевых протеинкиназ [10]

щих киназ: MAPK, MEK-киназы MAPK (MAPKK), киназы MAPKK (MAPKKK). Более того, в случае работы этих киназ организация путей передачи сигнала происходит с участием малых ГТФаз (Ras/Rho), активирующих исходную MAPKKK, и белков остова клетки, позволяющих соединению одновременно множества взаимодействующих компонентов. Такие MAPK-киназы, как ERK 1/2, а также p38 (подробнее о них ниже) активируют киназные домены МК-ферментов (рис. 5.5).

Ясно, что большое значение имеет изучение основ взаимодействия между этими двумя типами белков, которое должно осуществляться по принципу соответствия и подгонки взаимодействующих структур, что обозначается термином «докинг». Результаты такого изучения суммированы в обзоре [10].

Что касается МК, то в настоящее время на основании изучения первичных последовательностей макромолекул описано 11 МК-ферментов, составляющих 5 подсемейств. Это киназы, обслуживающие S6-белок рибосом (RSK-подсемейство), MSK-подсемейство, включающее активируемые в условиях стресса и действия митогенов киназы. Также к этому семейству относятся киназы MNK-подсемейства, взаимодействующие с другими MAPK-

киназами (MAPK-interacting kinases), и особые киназы 2 и 3, активируемые MAPK-киназами. В это семейство киназ входит подсемейство, называемое MK5-киназами [10].

В связи с возможностью создания стрессовой ситуации в клетке при применении цитотоксического лекарства рассмотрим подробнее киназу, регулирующую с помощью экстрацеллюлярных сигналов (ERK), и так называемые стрессактивируемые киназы SAPK1 — *C-Jun N terminal kinase* — JNK-киназа и SAPK2-p38 (рис. 5.5 и 5.6). Активация этих путей передачи сигналов определяет запуск генов раннего ответа клетки (*immediate-early genes*), определяющих регуляцию того или иного поведения клетки, ее способность к росту, дифференциации, апоптозу, а также физиологическое состояние клетки в условиях стресса [12–14].

При изучении ответа клетки на стресс большое внимание уделено исследованию действия высоких температур на клетку. Каковы же механизмы активации киназ с помощью таких стрессовых белков, как HSP-белки? Краткий ответ на этот вопрос состоит в указании роли цепных реакций фосфорилирования на уровне всех участников пути передачи сигналов с характерными отличиями и особенностями в каждом звене. В настоящее время известно, что HSP-белки активируют три типа MAP-киназ: ERK (киназа, активируемая экстрацеллюлярными сигналами), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) и киназа p38. В каждом случае используются разные механизмы активации [10, 17]. Так, для активации ERK необходимо фосфорилирование рецептора эпидермального фактора роста EGFR (как сенсора стресса), которое происходит при появлении в клетке стрессовых белков. Активация рецептора этого фактора роста вызывает активацию исходной киназы MAPKKK Raf1, сигнал от которой достигает ERK-молекулы (рис. 5.5). Что касается киназы JNK, то механизм ее активации связан не с тем, что происходит фосфорилирование JNK, как в случае ERK-киназы, а с тем, что такой фермент как серин/треониновая фосфатаза (PPase) ингибируется и фосфатные группы из молекулы JNK не удаляются, что и делает такую молекулу активной в процессе передачи сигнала. Таким образом, в клетке должен существовать какой-то отличный от рецептора факторов роста специальный сенсор, чувствующий появление в клетке стрессовых белков и запускающий активность JNK-киназы. При этом интересным оказалось то, что один из белков теплового шока, а именно HSP70 ингибирует активность JNK, и

чем больше он угнетает JNK, тем более клетки термоустойчивы. Следовательно, такая система активации киназ работает со своим внутренним тормозом, определяющим разумность в движении молекулярных сигналов.

Особый механизм установлен в случае активации стрессовой киназы SAPK2/p38 [17]. Он связан с возможностями клетки пойти по пути своего самоуничтожения — апоптоза. Оказалось, что в клетке есть специальная киназа, ответственная за регуляцию апоптотического сигнала — ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase-1*). В нормальном состоянии клетки она неактивна, так как сдерживается соответствующей формой двух видов молекул, определяющих показатели нормы физиологического состояния клетки. Это тиоредоксин (TRX) и глутатионтрансфераза (GST; в одной из форм — Mu — GSTM1-1). Первая молекула важна для осуществления контроля над редокс-потенциалом клетки за счет возникновения в соответствующих условиях функционирования восстановленной и окисленной форм тиоловых групп тиоредоксина. Таким образом, по состоянию тиоловых групп этой молекулы можно судить о появлении в клетке реактивных видов кислорода — ROS и, следовательно, TRX функционирует как сенсор окислительного стресса. В нормальных условиях TRX в восстановленной форме связан с ASK1 и препятствует ее функционированию. В окисленной же форме такая связь не устанавливается, и ASK1 активируется. Следовательно, ASK1 узнает множественные сенсоры и на тепловой шок, и на окислительный стресс.

Установлено, что GSTM1 также является ингибитором ASK1. Основная задача GSTM1 состоит, как указывалось ранее, в присоединении различных соединений клетки к молекуле глутатиона. Однако помимо ферментативной активности белок обладает резко выраженным свойством связывать различные молекулы, включая и ASK1. Таким образом, очевидно, возможен контроль наполнения клетки какими-то чужеродными веществами или эндобиотиками. Как стрессовые белки обуславливают диссоциацию комплекса GSTM1 и ASK1 еще неясно, хотя известно, что тепловой шок способствует появлению в клетке таких гидрофобных соединений, как сфингозин и керамиды, которые служат субстратами GST. Поскольку для их обработки требуются большие количества GST, комплекс GST—ASK1 диссоциирует, и ASK1 активируется. Как показано на рис. 5.6 распространение сигнала от ASK1 достигает молекулы p38.

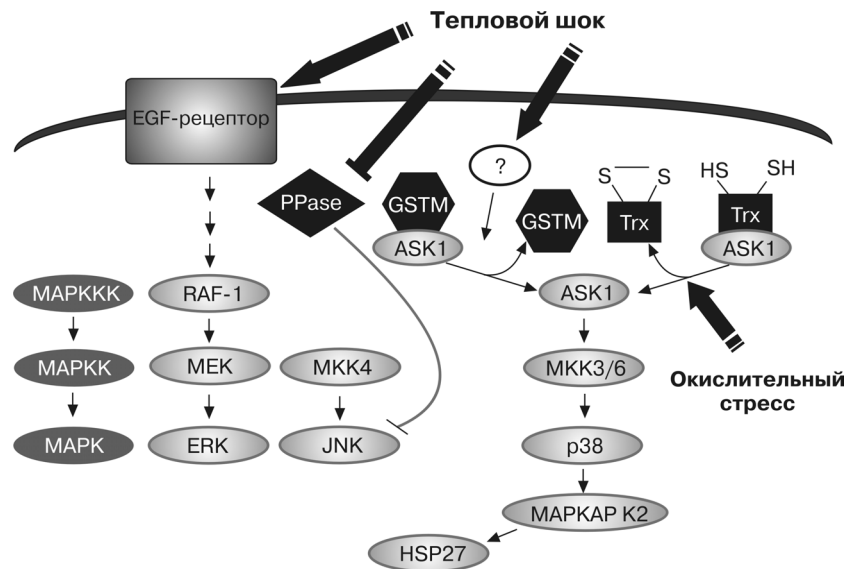


Рис. 5.6. Предполагаемые механизмы активации протеинкиназ при тепловом шоке [17]

Особенностью этой молекулы является ее способность управлять киназой (MK2), фосфорилирующей и активирующей содержащийся в клетке на базальном уровне белок HSP27, клиентом которого является такой компонент цитоскелета клетки, как белковые молекулы актина, способные образовывать филаменты. Белок HSP27 может стабилизировать эти филаменты и, таким образом, защищать клетку от неблагоприятного действия сложившихся условий функционирования. Однако, излишне полимеризуя актин, он может обусловить выпячивания клеточных мембран и полную деформацию цитоскелета, что приведет клетку к каспазозависимому апоптозу. Поражает продуманность работы этой сигнальной системы: вначале предпринять попытки возможных функциональных улучшений и только при невозможности таковых прекратить существование клетки.

При изучении действия ERK-киназы, отзывающейся на внешний стимул, оказалось, что она, получив сигнал от предшествующих киназ каскада и активируясь, сама активирует два класса последующих киназ каскада — RSK и MSK. RSK — это киназы, обнаруженные при исследованиях фосфорилирования белков рибо-

сом, в частности белка S6. Эти ферменты составляют две группы: белки p90 (RSK1,2,3,4) [10] и p70 (S6K1 и S6K2) [11]. В неактивированном состоянии эти белки локализируются в цитоплазме. В активированной же форме они перемещаются в ядро и фосфорилируют соответствующие транскрипционные факторы, запускающие работу IE-генов (*immediate-early gene response* [12]), продукты которых необходимы клетке в данный момент существования.

При изучении фосфорилирования мишеней, узнаваемых киназой p38, были обнаружены очень похожие на RSK-киназы ферменты, активирующиеся как при митогенном (ERK-сигнал), так и при стрессовом воздействии (p38-сигнал). Это MSK1- и MSK2-киназы, которые локализируются, в основном, в ядре и определяют при стрессе транскрипционную активность IE (*c-fos*, *junB*, *egr1*)-генов. Более того, активируется транскрипция генов, узнаваемых ядерным фактором NFκB и фактором STAT3 (*signal transduction and activator of transcription* — см. рис. 5.3). MSK1 и 2 определяют также характер расположения нуклеосом в клеточном геноме. Помимо быстрой индукции IE-генов, эти киназы фосфорилируют гистон H3 и ассоциирующийся с нуклеосомами белок из группы белков высокой мобильности (*high mobility group*) HMG14. От фосфорилирования этих белков зависит характер расположения нуклеосом в геноме, что очень важно для транскрипционной активности гена [12].

При изучении киназа клетки были выявлены близкородственные киназы, активирующиеся под действием ERK- и p38-киназ — киназа MNK1 и под действием только ERK — киназа MNK2 (см. рис. 5.5).

Для этих киназ установлен участок последовательности их молекул, отвечающий за взаимодействие с киназами ERK и p38. В связи с этим MNK1 и 2 были названы киназами, взаимодействующими с MAPK-киназами (MAPK — *interacting kinases*). Эти киназы локализируются в основном в цитоплазме (в области C-конца они содержат *nuclear export signal* — NES, сигнал для экспорта из ядра), хотя есть форма MNK2 без NES, которая выявляется в ядре покоящихся клеток. Эти ферменты обнаруживаются в организме повсюду, кроме мозга. В настоящее время считается, что киназы MNK1 и MNK2 определяют фосфорилирование фактора инициации трансляции у эукариот — eIF4F и, таким образом, отвечают за скорость трансляции в клетке. Смысл активации этих киназ при стрессе может заключаться в торможении процессов трансляции в возникших условиях функционирования клетки.

Различные подходы в изучении киназы позволили идентифицировать новые киназы, активируемые под действием р38. Они были названы МК2 и МК3. Изучена их структура, различные формы сплайсинга, показано, что одни их формы локализируются преимущественно в цитоплазме, в то время как другие — в ядрах покоящихся клеток, которые, однако, при стрессе быстро переходят в цитоплазму. Взаимоотношения между МК2 и МК3 не одновекторны: не только р38 активирует эти ферменты, но и они стабилизируют активность р38 и определяют локализацию последней киназы в клетке. Изучение активности МК2 и МК3 ведет в область регуляции трансляции мРНК, так как мишенью действия этих ферментов является фактор eEF2, отвечающий за элонгацию трансляции матрицы [10, 13]. Таким образом, клетка обладает средством в виде возможной активации МК2 и МК3, позволяющей в условиях стресса замедлять процесс синтеза новых молекул белков. Более того, эти киназы в условиях стресса фосфорилируют соответствующие транскрипционные факторы, также способствуя экспрессии генов раннего ответа клетки на стресс. Фосфорилируя белок остова клетки 14-3-3 ζ , объединяющего в комплекс компоненты сигнального пути, эти киназы могут выключать те сигнальные пути, которые зависят от этого белка скэффолда клетки.

Близкой по структуре к МК2 и МК3 оказалась вновь обнаруженная киназа МК5, выявляемая преимущественно в сердце и скелетной мускулатуре. Локализованная в обычных условиях в ядре, при стрессе эта киназа быстро переходит в цитоплазму, активируясь, возможно, также под действием киназы р38, хотя и при каких-то особых обстоятельствах. Мишени и функции этой киназы изучаются.

Обнаружение в почвенной микрофлоре такого биологически активного вещества, как рапамицин, ингибирующего рост грибного мицелия и злокачественных опухолей, привлекло большое внимание к изучению механизмов действия этого антибиотика. Оказалось, что рапамицин, поступая в клетку в результате связывания со своим рецепторным белком, ингибирует крупную молекулу вновь обнаруженной протеинкиназы, названной в случае млекопитающих mTOR (*mammalian target of rapamycin*) [18—20].

В mTOR обнаружен участок гомологии с киназой PI3K, которая в ответ на самый широкий спектр внешних воздействий на клетку фосфорилирует по 3'-ОН-положению такой компонент клеточных мембран, как фосфатидилинозитол. Образую-

щиеся вторичные мессенджеры, представленные модифицированными липидами, сразу же привлекают к мембране сигнальные молекулы, вовлекаемые в процессы активации и образования комплексов с различными белками, что увеличивает способность клетки отвечать на разные сигналы.

Однако mTOR оказалась не липидной, а Ser/Thr-белковой киназой [21]. Смысл же ее подобию с киназой PI3K заключается в том, что среди узнавания неисчислимого множества факторов возможного внешнего воздействия киназа mTOR настроена на восприятие ситуации по снабжению клетки питанием (фермент активируется при аминокислотном, азотном, глюкозном голодании [22]) и энергией (фермент активируется при увеличении соотношения АМФ/АТФ) [23]. Работу этой киназы по цепочке в упряжке с другими ферментами обозначают в виде пути — *pathway*, который в данном случае представлен активностью таких киназ, как PI3K/Akt/mTOR. Если PI3K отзывается на митогенный сигнал, включающий программу деления клетки, то в задачу mTOR входит оценка ресурсов клетки, необходимых для этого процесса.

Изучение киназы mTOR позволило установить, предшествующая работа каких структур клетки важна для активации этой киназы, как работает сама эта киназа и каково следствие ее работы. Оказалось, что при некоторых патологиях в клетке образуется специфический комплекс белков, названный TSC (*tuberous sclerosis complex*). Идентифицированы два гена TSC1 и TSC2, мутации в которых вызывают патологии. При этом в клетке даже в условиях голода резко возрастает уровень фосфорилирования субстратов действия mTOR, таких, как регулирующих трансляцию молекул киназы S6K1 и фактора инициации трансляции 4E-BP1. Напротив, при суперэкспрессии TSC1/TSC2 фосфорилирование этих молекул ингибируется независимо от условий роста клетки. Установлено, что состояние активности TSC-комплекса также определяется состоянием фосфорилирования определенных участков этих белков, являющихся местом действия киназы Akt. Таким образом, начальный этап активации киназы mTOR определяется состоянием TSC1/2-белков, связывающих работу киназ PI3K и mTOR через действие киназы Akt. Как этот комплекс определяет активность mTOR? Был обнаружен специальный белок Rheb, представляющий собой малую ГТФазу. Белок же TSC2 содержит GAP (*GTPase-activating protein*)-домен, способный взаимодействовать с ГТФазами, превращая их из активной ГТФ-свя-

занной в неактивную ГДФ-связанную форму. Наличие в клетке Rheb-белка приводит к активации в любых условиях функционирования mTOR, фосфорилирующей и активирующей мишени ее действия: S6K1, S6K2 и 4E-BP (рис. 5.7, см. вклейку).

Помимо молекул, определяющих начальные условия активации mTOR, этому ферменту присущ ряд особенностей. Во-первых, он всегда функционирует в комплексе с белком GbetaL 36 кДа, во-вторых, активность этой киназы определяется образованием двух своеобразных комплексов. Один из них представлен большим белком (150 кДа), называемым *raptor* (*regulatory associated protein of TOR*). Возможно, это белок остова клетки, соединяющий по консервативным мотивам эту киназу и ее субстраты в единое целое. Комплекс mTOR с raptor подавляется рапамицином. Подробные данные изучения этого комплекса описаны в [18, 24]. Однако установлено образование mTOR с другим белком, названным *riCTOR* (белок mAVO3). Особенности этого комплекса являются его нечувствительность к рапамицину и то, что он вовлекается в процесс полимеризации такого компонента цитоскелета клетки, как актин.

Это имеет значение при распространении клеток по организму. В настоящее время эти комплексы обозначаются соответственно mTORC1 и mTORC2. Большое внимание уделяется локализации этих комплексов в клетке и ее влиянию на функцию комплексов [25, 26]. Поскольку субстратами фосфорилирования с помощью активированной киназы mTOR являются молекулы белков, осуществляющие процесс трансляции, то регуляция активности этой киназы важна для определения роста клеток и их размеров. (Известно, что для матки пчел, превосходящей в несколько раз обычных пчел по размеру, характерна суперэкспрессия по киназе mTOR.) Состояние злокачественности клетки также связано с активностью этой киназы. Связь механизмов роста клетки с активностью mTOR представлена на рис. 5.8 (см. вклейку) и 5.9.

Рис. 5.9 суммирует использующий mTOR-киназу установленный ряд процессов функционирования клетки: транскрипцию, стабильность белков, процессинг РНК, или соответствующую подгонку ее структуры, трансляцию белков и аутофагию клетки.

Итак, моментальная активация сигнальных киназ в клетке при действии стрессового фактора указывает на первоочередное значение приведения в боевую готовность таких клеточных средств, которые определяют способность клетки либо к выжи-

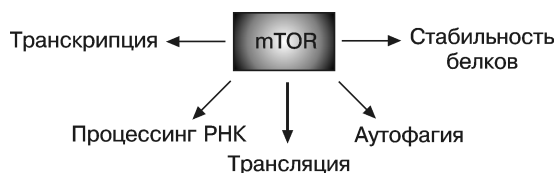


Рис. 5.9. Участие киназы mTOR в ряде клеточных процессов [20]

ванию, либо, напротив, к смерти. В международной литературе они называются соответственно *pro-survival* и *pro-apoptotic pathways*. Кратко охарактеризуем эти пути.

5.4. О ДВУХ ОСНОВНЫХ ПРОГРАММАХ КЛЕТКИ: ВЫЖИВАНИЕ И СМЕРТЬ (АПОПТОЗ)

Культивирование клеток *in vitro*, осуществленное первоначально в случае культур клеток животных, показало, что предотвращению массовой гибели клеток вне организма, т. е. в культуре *in vitro*, способствует добавление такого компонента среды культивирования, как сыворотка крови. Изучение ее состава позволило идентифицировать молекулы, необходимые для выживания клетки. Они получили название факторов выживания, представленных в основном различными ростовыми факторами и компонентами внеклеточного матрикса. Примеры этих факторов приведены ниже:

Вид молекул	Фактор выживания
Факторы роста	Эпидермальный (EGF), тромбоцитарный (PDGF), инсулино-подобный (IGF-1), эстроген, цитокин IL2, тромбин
Внеклеточный матрикс	Фибронектин, витронектин
Молекулы контакта клеток	Кадгерин
Онкогены	Ras, v-Raf, Bcr-Abl
Продукты генов, важных для дифференциации клеток	Bcl-2, Mcl-1
Вирусные гены	SV40 T-антиген, Ad5 E1B, EBV BHRF1

Оказалось, что факторы выживания клеток узнают соответствующие клеточные рецепторы и, связываясь с ними, активируют те или иные внутриклеточные пути передачи сигнала, в которые вовлекаются каскады MAP киназ. (Наиболее изучены такие сигнальные пути ответа клетки на внешние воздействия и внутриклеточный стресс, как пути MAPK-каскада, активируемые не

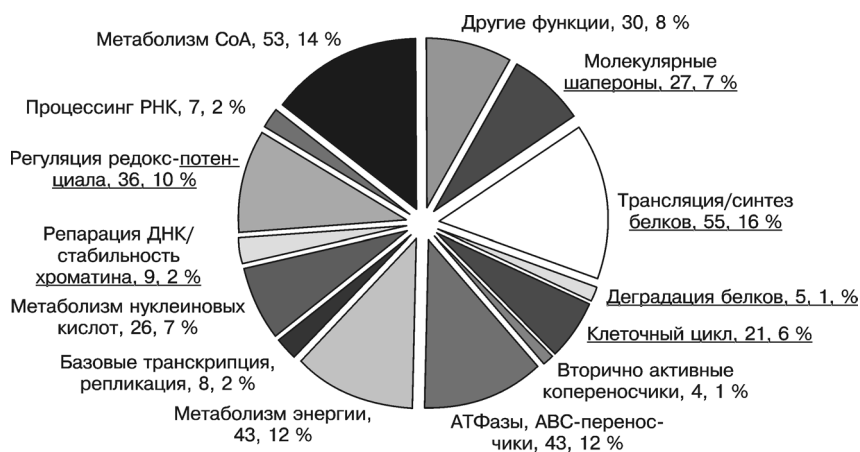


Рис. 5.10. Классификация 368 генов, консервативных для всех трех царств биологических видов. Подчеркнуты гены, вовлеченные в ответ клетки на стресс [34]

только «сверху вниз», но и с помощью боковых ответвлений [27], а также PI3K/Akt/mTOR [28, 29] — см. рис. 5.3. Более того, показано, что в клетках опухоли, леченной с помощью досетакселя, повышается уровень экспрессии гена, кодирующего киназу PIM1. Молекулярные взаимодействия, выстраиваемые по оси STAT3—PIM1—NFκB, резко улучшают выживание таких клеток [30]. Выживание клеток также повышается при активации киназы, связанной с интегрином — ILK. В результате такой активации фосфорилируется киназа Akt и, таким образом, запускается весь сигнальный путь выживания клетки [31, 32].)

Активация сигнального пути позволяет отвечать на стресс повышением активности нескольких ключевых генов, перестройкой цитоскелета, остановкой клеточного цикла [32]. Например, при хронической гипоксии в раковой опухоли из-за активации соответствующих генов увеличивается содержание белков, замедляющих скорость пролиферации, переключающих митохондрии на процессы гликолиза, ингибирующих апоптоз и стимулирующих ангиогенез и метастазирование [33]. В настоящее время при имеющейся, в общем, фрагментарности в построении полной панорамы состояния клетки при стрессе установлено, что на пути сохранения гомеостаза клетка, независимо от видового происхождения, прибегает к использованию практически одного и того же набора генов, кодирующих высококонсервативные белки (т. е. сохраняющиеся неизменными в процессе эволюции) (рис. 5.20) [34]. Этот стрессо-

вый протеом включает молекулярные шапероны, регуляторы протеасомной деградации белков, регуляторы клеточного цикла и белки, осуществляющие репарацию ДНК.

Отметим, что фирма Superarray — <http://www.superarray.com/> — разработала носители для изучения 263 генов, реагирующих на стрессовые условия, токсичность действия малых молекул, возникновение хемоустойчивости и особенности метаболизма лекарства. Гены охватывают системы самоуничтожения клетки — апоптоза, клеточного цикла, различных переносчиков молекул, ответа на разные виды стресса, белки теплового шока и различные шапероны, транскрипционные факторы и регуляторы, ферменты метаболизма лекарства. Информационные бюллетени фирмы снабжены цитированием обширной библиографии относительно каждой группы генов. При срабатывании сенсорных механизмов клетки, (а индикатором стресса может выступать степень повреждения макромолекул в виде изменений в конформации белков и редокс-потенциала клетки [34]) усиление функции генов стрессового протеома и дает клетке шанс выжить с помощью требующих времени включений различных адаптивных и репарационных механизмов. Кратко рассмотрим данные изучения стрессового протеома клетки.

5.4.1. Молекулярные шапероны

Итак, выше отмечено, что действие на клетку повышенных температур по сравнению с физиологическими условиями приводит к накоплению белков теплового шока. Как шапероны они ответственны за сохранение нативной конформации белков, предотвращая в клетке их беспорядочную агрегацию, и как шаперонины они непосредственно определяют правильность укладки белковых молекул в клетке. Выделяют пять основных семейств этих белков: HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 и HSP110/104 [35]. Они находятся в различных компартментах клетки и особенно многочисленные исследования посвящены тем белкам этого класса, которые локализованы в эндоплазматическом ретикулуме (ER) клетки. Они относятся к семействам HSP70 и HSP90 и их особенность состоит в том, что они накапливаются в клетке в условиях глюкозного голодания. Отсюда они получили название GRP-белков (*glucose-related proteins*). Наиболее изучены белки GRP94 (gp96), GRP78 и GRP170. Однако помимо глюкозы факторами индукции этих белков служат также окислительный

стресс и вообще самые различные виды стресса, которые, как показано в многочисленных исследованиях [36], влияют на укладку белков в ER. Следовательно, при появлении белков с нарушенной укладкой ER способен выступать в роли контрольного пункта (*чекпойнта* — *checkpoint*) порядка в клетке и сенсора клеточного стресса, в первую очередь воспринимающего вызываемые стрессом изменения в этом компартменте клетки. Более того, ER должен обладать также эффекторным механизмом, либо принимающим меры по защите клетки и ликвидации этих изменений, либо при их чрезмерности обрекающим клетку на самоуничтожение, апоптоз. Таким образом, при своем функционировании клетка должна быть информирована о состоянии нативности белковых молекул и степени их возможных нарушений. Это происходит с помощью сигналинга, который получил название ответа на нарушение укладки белков — UPR (*unfolded protein response*). Установлено, что при стрессе повышается уровень синтеза 12 белков ER-компартамента. Значительная их часть представлена белками, ответственными за укладку белковых молекул, что и является задачей, решаемой такими молекулами, как шапероны. Принцип активации их генов при стрессе удалось установить при работе с клетками дрожжей. В этом случае в промоторах генов шаперонов был идентифицирован элемент UPRE, отвечающий на UPR-сигнал, и это помогло охарактеризовать компоненты пути передачи UPR-сигнала.

При работе с клетками дрожжей, и высших эукариот обнаружено три типа сенсоров, воспринимающих стрессовое состояние ER. Они определяют три ветви передачи UPR-сигнала и представлены такими трансмембранными белками, как киназы IRE1 (*inositol-requiring enzyme*), PERK (киназа, активируемая двуспиральной РНК) и ATF6 (*activating transcription factor 6*) (рис. 5.11, см. вклейку).

Первые две киназы относятся к мембранным белкам I типа, они пересекают мембрану один раз так, что NH₂-конец находится с внешней стороны мембраны, а COOH-конец — с ее внутренней стороны. В случае мембранных белков II типа эта ситуация прямо противоположна. Киназа ATF6 — это мембранный белок II типа, С-конец которого выглядывает в просвет ER, а отрезаемый во время стресса от сенсора цитозольориентированный N-конец определяет образование активного транскрипционного фактора, содержащего лейциновую застежку-молнию, важную при активировании соответствующих генов [36, 37]. Схема функционирования сенсоров стресса ER показана на рис. 5.11 [38].

При изучении киназы IRE1 был раскрыт механизм необычного сплайсинга, активирующегося только при стрессе, в результате которого создается особый транскрипционный фактор, обеспечивающий считывание генов, необходимых для ликвидации стресса. Домен этой киназы, выступающий в просвет ER, в условиях нормы связывает шаперон Bip, базальный уровень которого имеется в клетке, и это делает киназу неактивной. При нарастании в клетке количества неструктурированных белков при стрессе шаперон покидает киназу, и она может активироваться за счет образования гомодимера. Другой киназный домен в цитоплазме фосфорилирует *in trans* соответствующие сайты этой киназы, образующей димер при стрессе. При этом активируется С-концевой домен киназы, представляющий собой специальную эндонуклеазу, способную разрезать предшественник мРНК, который кодирует у дрожжей этот особый транскрипционный фактор Hac1 (у человека это фактор XBP1). После разрезания и сшивания с помощью специального фермента мРНК становится трансляционно способной. Это происходит только при стрессе и в норме такой предшественник никогда не транслируется. Синтезированный в условиях стресса Hac1 узнает UPRE и стимулирует экспрессию нужных генов. У человека эта тема имеет свои вариации, описанные в обзоре [39]. Более того, киназа IRE1 может образовывать комплекс с такой молекулой, как фактор 2, ассоциированный с рецептором цитокина TNF (*tumor necrosis factor*) — TRAF2. Этот комплекс способен активировать киназу JNK, важную для выживания клетки.

Итак, шапероны, индуцирующиеся при стрессе в таком важном компартменте клетки, как ER являются средством борьбы клетки за выживание, которому способствует эффективное исправление пространственных дефектов в белках [40]. Однако эта борьба может стать значительно легче, если уменьшить в клетке объемы синтеза бракованных молекул. Это возможно с помощью подавления процессов трансляции в случае инактивации за счет фосфорилирования фактора инициации трансляции eIF2 α , являющегося членом указанного семейства киназ. Общее снижение скорости трансляции белков в условиях фосфорилированного eIF2 α не распространяется на такую молекулу, как транскрипционный фактор ATF4, селективно накапливающийся в стрессовых клетках. Этот фактор активирует экспрессию специального гена CHOP (*C-EBP homologous protein*), активность которого связана с ответом клетки на повреждение ДНК, а также

гена шаперона *Bip*. Складывается впечатление, что клетка решает задачу приведения в боевую готовность как можно больше своих средств защиты, так как в условиях стресса наблюдается также переход фактора ATF6 из ER в аппарат Гольджи, где известные site-1- и site-2-протеазы обрезают эту молекулу так, что она становится активной. Таким образом, в клетке создается ситуация усиленного действия совместно двух активных факторов — ATF4 + ATF6. Все это необходимо для того, чтобы гарантировать обеспечение клетки особым стрессовым транскрипционным фактором вначале в виде длинного неактивного продукта, который перейдет в короткую активную форму в результате сплайсинга как описано выше. Всегда ли клетка может выйти из стрессового состояния? В настоящее время считается, что возможность связи киназы IRE1 с фактором TRAF2 и активация киназы JNK, а также усиление транскрипции гена CHOP, функционирующего как ингибитор антиапоптотического белка Bcl2, и активация каспаз 7 и 12 информируют клетку о глубоком и длительном стрессовом воздействии, что и включает программу запрограммированной смерти клетки. Таким образом, UPR — это сигналинг и на жизнь, и на смерть клетки, все зависит от длительности возникшего сигнала.

Отметим также, что ингибирование синтеза белков в случае фосфорилированного фактора инициации трансляции влечет за собой дефицит в клетке белков, ответственных за протекание клеточного цикла, в частности белка, циклин D1. Его дефицит останавливает клеточный цикл на стадии фазы G₁ и, следовательно, в организме не увеличивается количество клеток, находящихся в состоянии стресса. Таким образом, UPR-сигналинг обеспечивает защитную функцию на уровне не только клетки, но и организма.

Изучение UPR-пути передачи сигнала также ставит проблему важности персональной медицины и контроля над работой этого сигналинга и результирующим поведением клетки при применении того или иного цитотоксического лекарства.

Итак, стрессовое воздействие на клетку, с неизбежностью нарушающее в ней укладку белков, может быть нейтрализовано такими ее потенциями, как функционирование шаперонов, остановка синтеза белков, а также с помощью такого приема, как освобождение клетки от испорченных и отслуживших белков за счет их деградации. Недавно установлен механизм такой деградации, основанный на использовании специального молекуляр-

ного устройства, получившего название протеасомы и обслуживающего его аппарата. Однако открытие такой потенции клетки, как протеасомная деградация белков позволило раскрыть основополагающее значение этой клеточной системы функционирования не только в очистительных целях, но, очевидно, в первую очередь, как мощного и универсального регулятора элементарных процессов клетки, ибо эта система наделена способностью определять, будет ли в клетке действовать то или иное начало, или оно со всеми вытекающим из этого последствиями будет изъято из обращения [41]. Кратко охарактеризуем механизм протеасомной деградации белков.

5.4.2. О протеасомной деградации белков

С самых ранних этапов развития биохимии считалось, что ненужные клетке белки разрушаются до отдельных аминокислот с помощью протеолитических ферментов, содержащихся в органеллах клетки, которые называются лизосомами. Однако лизосомы не содержат такие клетки, как незрелые эритроциты — ретикулоциты, но в них все равно происходит деградация белков, зависящая от АТФ. Следовательно, существуют различные биохимические пути, приводящие к деградации белков. Изучение этих путей увенчалось большим успехом, отмеченным Нобелевской премией, присужденной в 2004 г. А. Ciechanover, А. Herzhko и I. Rose. Исходным моментом в открытии новой, ранее неизвестной одной из существующих систем деградации отработанных и испорченных белков стало обнаружение при изучении модификаций молекул гистонов, характеризующихся двумя N-концами. Этот факт нашел объяснение, заключающееся в том, что молекула гистона в определенных случаях ковалентно связывается с таким вездесущим белком из 76 аминокислот, как убиквитин, функция которого в клетке оставалась неизвестной. Вскоре было установлено, что убиквитин используется как метка для тех молекул, которые должны быть разрушены. Следовательно, предстояло выяснить, как идет узнавание этих белков, как прикрепляется к ним метка, как осуществляется процесс деградации меченых белков, и какие последствия для клетки могут иметь свои в работе этой системы.

Выяснение пути образования в клетке убиквитированного того или иного белкового субстрата позволило установить ступенчатый характер образования такого продукта. Вначале убик-

витин активируется с помощью специального убиквитинактивирующего фермента E1. Он гидролизует АТФ и образовавшийся аденилат присоединяется к молекуле убиквитина (рис. 5.12, а) [42]. Активированный убиквитин связывается с цистеиновым остатком активного центра E1, который в это же время активирует вторую молекулу убиквитина, образуя цепь из этих молекул. Затем активированный убиквитин переносится с фермента E1 на цистеиновый остаток фермента E2 — *UBC-ubiquitin-conjugating enzyme*. С этой промежуточной стадии обработанная молекула убиквитина переносится на третий фермент E3-убиквитинлигазу (в настоящее время уже описано несколько таких ферментов) [41]. Этот фермент узнает различные белковые субстраты и присоединяет к ним полиубиквитиновые цепи, воспринимаемые в клетке как сигнал к деградации белка. Изученные в настоящее время убиквитинлигазы составляют четыре семейства, узнающие соответствующие белки. Первое из них узнает белки согласно правилу N-конца [43]. (Одни белки с характерной последовательностью этого конца живут дольше, другие — короче.) Второе семейство лигаз узнает белки, содержащие домен HECT (например, большая субъединица РНК-полимеразы II, онкосупрессор p53 и др.). Третье и четвертое семейство этих лигаз узнают различные регуляторы клеточного цикла, определяя время жизни и функционирование этих молекул в клетке. В настоящее время считается, что в некоторых случаях белковой деградации необходимо присоединение к белку особо длинной цепи из молекул убиквитина. Такая цепь образуется под действием специального фермента, названного E4 [44].

Как происходит узнавание субстратов, подлежащих убиквитированию? Основной действующей силой такого узнавания является структурный мотив субстрата [41]. Он может быть записан в структуре молекулы данного белка изначально (*N-end rule*) и до определенной поры и ситуации в клетке может быть маскирован различными способами. А может создаваться вновь за счет различных посттрансляционных модификаций. Известно, что фосфорилирование соответствующих сайтов для многих белков служит сигналом к их деградации. Ясно, что такое фосфорилирование также является результатом активации соответствующих биохимических путей и трансдукции специальных сигналов, необходимых для поддержания гомеостаза клетки. Следует отметить, что при регуляции процесса деградации белков также возможно двоякое прочтение сигнала фосфорилирования: установ-

лены случаи, когда эта модификация белка, напротив, служит знаком для эффекторных систем к запрету деградации. Поистине поражает уровень разнообразия, достигаемого в биологии.

Еще одним фактором узнавания белка, обрекаемого на деградацию, является наличие в его молекуле специального участка, названного участком разрушения (*destruction box*). Обычно он составляет определенную последовательность из 9 аминокислот, появление фосфатных групп в которой определяет судьбу этого белка.

Итак, белок, прошедший все стадии убиквитирования и получивший полиубиквитиновую метку (возможен моновариант), должен быть разрушен. Как это происходит? При изучении продуктов седиментации материала ядерного и цитоплазматического происхождения получены специальные обладающие протеолитической активностью комплексы, которые в полностью собранном виде получили название 26S-протеасом (700 кДа, 28 субъединиц). При разделении этой структуры на составляющие были идентифицированы центральная часть — 20S и две периферические структуры — 19S (обнаружены также и 11S-комплексы), охватывающие 20S снизу и сверху (рис. 5.12, б).

Центральная часть — это протеолитический цех, состоящий из наложенных друг на друга четырех колец. Наружные кольца сложены из структурных α -субъединиц, внутренние — из β -каталитических субъединиц протеолитического расщепления. Центральная часть устроена в виде полости, куда и попадают на переработку молекулы белков, освободившись предварительно от убиквитиновых меток, способных использоваться повторно. Полость закрыта крышкой из 19S, в которой имеется рецептор, связывающий убиквитин. Наличие в этом комплексе значительной АТФазной активности дает возможность образовывать отверстия, через которые полимеры могут попадать в полость и выходить из нее после переработки в виде фрагментов.

Важное значение для протеасомной деградации имеет конформация белка: может ли в полость попасть молекула с ненарушенной укладкой (процесс движений таких белков называется транслокацией и еще неясно как белки доставляются к протеасоме) или пространственная укладка белка должна быть нарушена. Этот вопрос изучается, но очевидно, что протеасомы могут работать в двух режимах. Один из них — это способность на входе обрабатывать крупные белки и на выходе давать крупные фрагменты. Эти последние при втором режиме работы узнаются

частицами 11S и перерабатываются до отдельных аминокислот как строительного материала и до олигопептидов. (Такие предварительно фрагментированные молекулы белков нужны для маркерной загрузки иммунного комплекса MHC1, необходимого для узнавания организмом своих и чужеродных белков.)

Важность убиквитиновой системы деградации для жизнедеятельности клетки демонстрирует также тот факт, что, очевидно, во избежание ошибок при внесении разрушительных меток в белки природа пошла по такому пути, чтобы занять место прикрепления к белку убиквитина некой подобной молекулой, которая, однако, не позволит направить такой белок на переработку в протеасому. Более подробные данные об убиквитинподобных белках представлены в обзоре [40]. Здесь в качестве примера приведем гомолог убиквитина белок SUMO1 — *small ubiquitin-related modifier*. Среди белков ядерной поры (*nuclear pore complex* — NPC) есть обладающий ГТФазной активностью белок, необходимый для транспорта в ядро нужных белков и рибонуклеопротеинов. Для того чтобы осуществлялась регуляция цикла ГТФ/ГДФ при работе этого белка, необходимо привлечение к ядерной поре другого белка, который должен быть обязательно модифицирован с помощью SUMO1 [40]. Таким образом, принцип убиквитиновой метки имеет широкие функциональные границы, распространяющиеся от регуляции времени жизни белков до оптимизации функционирования отдельных биохимических путей.

Итак, протеасомная деградация белков — это мощное средство поддержания гомеостаза клетки за счет эффективной регуляции на уровне клетки того или иного процесса, определяющего ее жизнеспособность. Одним из факторов достижения такой эффективности является протеасомный контроль функции ряда транскрипционных факторов (FOX1, YB1, PAX3, Kcap1), определяющих картину активности тех или иных генов в нужное время жизни клетки. Ясно, что возможность управления поведением клетки с помощью процесса белковой деградации соответствующих элементов отдельных процессов требует умения сдвигать такую биодеградацию в сторону как выключения, утраты функции этой системы, так и ускорения и увеличения масштабов работы этой системы. Оказалось, что наблюдается естественная модуляция протеасомной протеолитической активности. Это зависит от управления протеолитического цеха со стороны двух протеасомных регуляторов. Они представлены комплексами 19S и 11S, или PA700 и PA28. Регуляторная функция этих комплек-

сов интенсивно изучается [45—51]. Важность изучения заключается в том, что наблюдаемые природные сбои функционирования протеасом становятся причиной многих заболеваний, включая нейродегенеративные болезни и рак. Показано, что при раке крови уровень протеасом в сыворотке крови значительно повышается. Очевидно, при таких условиях нарушается регулируемая деградация белков клеточного цикла и белков, направляющих клетку по пути апоптоза. При ингибировании же протеасом с помощью ингибитора бортезомиба (Velcade®) наблюдался его антираковый терапевтический эффект. Оказалось, что бортезомиб может активировать подавленную в злокачественных клетках систему апоптоза, активируя путь, на котором действует киназа p38 [48], а также снижая уровень фосфорилирования киназы Akt как основного фактора, направляющего клетку по пути выживания [49]. Однако терапия с помощью бортезомиба становится неэффективной вследствие возникновения мутаций в генах, кодирующих компоненты протеасом. Одним из таких генов оказался амплифицирующийся ген субъединицы β5 — PSMB5 [50].

Поскольку такой важный процесс жизнедеятельности клетки, как клеточный цикл деления, представленный исполнительными и регуляторными механизмами, зависит от работы убиквитинной системы деградации белков, кратко остановимся на рассмотрении вопроса об активности регуляторов клеточного цикла и их роли в поддержании гомеостаза клетки.

КОНТРОЛЬ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТКИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВ

Это одна из наиболее интенсивно изучаемых проблем современной биологии, достижения в изучении которой отмечены в 2001 г. Нобелевской премией, присужденной L. Hartwell, P. Nurse и T. Hunt. Полученная информация широко представлена в Интернете и обобщена в монографии [1]. Здесь отметим следующее.

Ранние цитологические исследования поведения хромосом при делении клетки высших эукариот позволили установить (рис. 6.1.) различные фазы клеточного цикла. Это фаза G_1 (gap 1) — период роста и подготовки клетки к удвоению генетического материала. Следующая фаза — S-период репликации ДНК. Затем это фазы G_2 (gap 2) — период проверки безошибочности редупликации генетического материала и M — митоз, включающий распределение по одной из двух копий набора хромосом между двумя образующимися дочерними клетками и образование перегородки, делящей исходную клетку на две дочерние (цитокinesis). (Многоклеточные организмы с их порядка 100 000 млрд клеток [20] содержат большое количество таких из них, как правило, высокодифференцированных, которые не способны к пролиферации. Поломки в этих клетках, очевидно, не так опасны, потому что их неспособность к размножению минимизирует вред, причиняемый организму, и служит как бы альтернативой апоптозу. Состояние таких клеток, не отличающихся от тех, которые находятся в фазе G_1 , обозначается G_0 .) Использование такого объекта, как дрожжи (одноклеточный организм с организацией, присущей эукариотам, но содержащий лишь одну копию, или гаплоидный набор хромосом) и возможность манипуляций с условными (температурочувствительными) мутантами, несущими примерно в сотне генов мутации, нарушающие клеточное деление *cdc* (*cell division cycle*), позволили изучать процессы деления клетки на механизменном, молекулярном уровне. Прежде всего, было установлено, что основными игроками этого процесса яв-

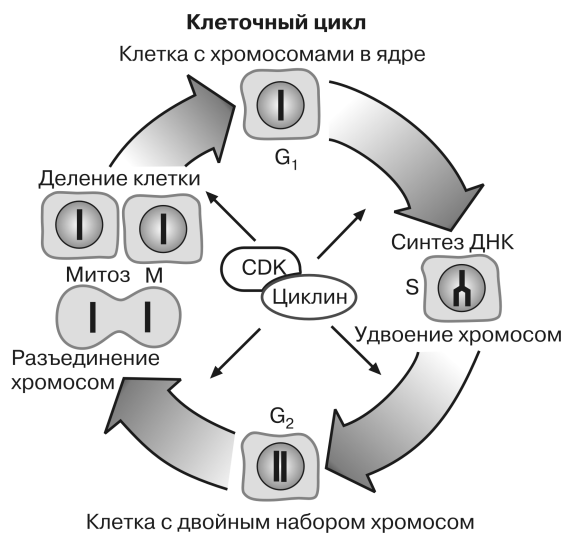


Рис. 6.1. Схема клеточного цикла эукариотической клетки [http:// nobelprize.org 2001 Physiology or Medicine Press Release, 8 Oct. 2001]

ляются специальные периодически появляющиеся в клетке на короткое время и тут же исчезающие молекулы, получившие название циклинов, составляющие несколько групп белков (А, В, С, D, Е, Н). Их узнает неизменный от вида к виду набор циклинзависимых киназ (CDK — *cyclin-dependent kinases*), которые модифицируют свои специальные субстраты, активируя ту или иную функциональную активность. Поскольку эти киназы находятся в клетке конститутивно, необходимы их специфические ингибиторы, до поры до времени сдерживающие соответственно ситуации в клетке функцию этих ферментов. Помимо активирующего взаимодействия с циклинами и подавляющего взаимодействия с ингибиторами активность киназ этого типа определяется состоянием фосфорилирования фермента в районе Thr160 (в зависимости от вида фосфорилируется либо Thr160, либо Thr161) и ингибиторным эффектом фосфорилирования Thr 14 и Tyr15. Следовательно, к игрокам процесса деления клетки относятся также дефосфорилирующие ферменты—фосфатазы и регуляторы их активности. Эти компоненты должны запустить процесс деления клетки, провести его однонаправлено через все стадии цикла, проверить отсутствие какого-либо информационного или структурно-молекулярного брака и остановить цикл при выявлении такового с целью либо возможного исправления брака, либо уничтожения его носителя.

Изучение *cdc*-мутантов дрожжей позволило создать картину клеточного цикла (рис. 6.2) и показало, что для того, чтобы начался цикл клеточного деления, необходим запуск процесса, получившего название «старт». Его запускает киназа *cdc2*, обозначаемая как Cdk1, потому что у высших эукариот существуют родственники — Cdk2 — Cdk8. Ее комплексообразование с тремя циклинами одной группы, синтезируемыми в G₁, дает возможность выполнить функцию старта. Затем Cdk1 переключается на циклины другой группы и благодаря этому комплексу активируется область *ori*: фазы S, G₂ и вхождение в митоз становятся возможными. В случае высших эукариот тема вхождения в цикл имеет свои вариации. Для тщательной проверки готовности клетки к делению на границе фаз G₁ и S, называемой точкой рестрикции (или старта в случае дрожжей), под стимулирующим действием фактора роста должна произойти замена активирующей киназу циклина. Так, если при готовности клетки к циклу активируются Cdk4 и Cdk6 с помощью циклина D (с участием и других факторов), то в рестрикционной точке цикла этот комплекс заменяется Cdk2—циклин E, подготавливающим клетку к S-фазе (рис. 6.3). Успешный ход этой фазы контролируется комплексом этой киназы с циклином A. После окончания данной фазы клетка, во избежание даже минимальных неточностей в ра-

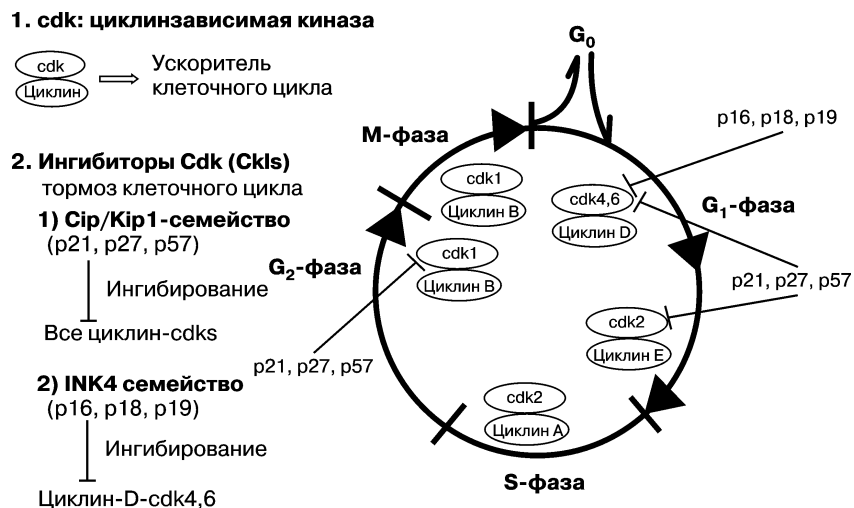


Рис. 6.2. Регуляция клеточного цикла с помощью комплексов циклинзависимых киназ, их ингибиторов, а также циклинов

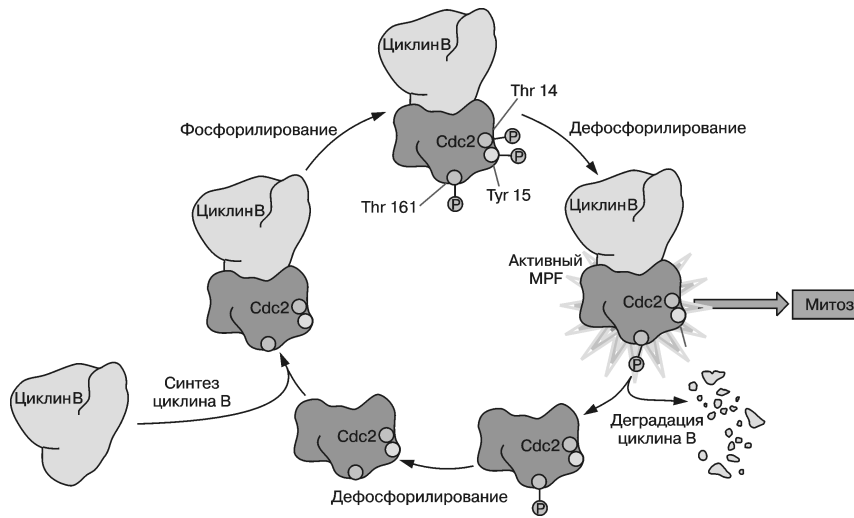


Рис. 6.3. Регуляторы клеточного цикла с демонстрацией роли фосфорилирования—дефосфорилирования Thr14, Thr161 и Tyr15 Cdc2 [The Cell: A Molecular approach / 2nd ed. Ed. by G.M. Cooper — Sunderland (MA): Sinauer Assoc., 2000]

боте с распределяемым материалом, опять «меняет коней на переправе». В конце этой фазы происходит замена комплекса Cdk2—циклин А на комплекс киназы Cdc2 (Cdk1) и циклина В, ответственного за вступление клетки в G_2 -фазу и митоз. Это так называемый MPF-комплекс — *M-phase promoting factor*. Безукоризненное протекание цикла отражает ритмичную работу предшествующих стадий и MPF, обусловленных регулируемой сменой периодов активации (за счет связи с циклином, фосфорилированием одних остатков киназы и дефосфорилированием других — ферменты этих процессов известны) и дезактивации (за счет деградации циклина, полного дефосфорилирования киназы).

Итак, начало клеточного цикла у высших эукариот связано с активацией комплекса Cdk4,6—циклин D. Одним из субстратов его фосфорилирования оказался белок, мутация в котором приводила к возникновению редко встречающегося рака глаз у детей — ретинобластомы. Белок, получивший название pRb, относится к классу тормозящих рост опухоли онкосупрессоров. Он играет ключевую роль в протекании клеточного цикла. При прохождении через рестрикционную точку комплекс Cdk4,6—циклин D фосфорилирует pRb и он утрачивает связь с транскрипци-

онным фактором E2F (образующим димеры с белковыми факторами DP1, DP2 и DP3—E2F/DP), усиливающим экспрессию, в частности гена циклина E. (Таким образом, pRb функционирует как выключатель: в нефосфорилированном виде он предотвращает запуск следующей фазы цикла, выступая в качестве репрессора синтеза циклина E, а в фосфорилированном — его активатора. Ясно, что при поломке выключателя функция не регулируется.)

При обнаружении же каких-либо дефектов ясно, что прогрессию цикла нужно приостановить, чтобы сосредоточить ресурсы клетки на возможности использования соответствующих репаративных процессов. Для этого должен сработать сенсорный механизм, воспринимающий появившийся дефект, и механизм, тормозящий каталитическую функцию киназы. Оказалось, что при наличии поломки в ДНК делящейся клетки внутриклеточная концентрация такого белка, как p53 резко повышается. Поскольку этот белок обладает свойством транскрипционного фактора и узнает промотор белка p21WAF1, экспрессия гена этого белка увеличивается и белок накапливается в клетках с поврежденной ДНК. Белок p21WAF1 обладает способностью связываться с CDK-киназами, полностью ингибируя их функцию. Следовательно, повышение концентрации этого белка при выявлении дефектов в ДНК делящейся клетки выступает эффективным тормозом каталитической функции киназы, важной для остановки процессов деления клетки. Более того, p21WAF1 способен также ингибировать такой белок, как PCNA, представляющий собой большую субъединицу репликативной ДНК-полимеразы дельта. Инактивация этого фермента, возможно, облегчает привлечение какого-то иного необходимого для осуществления репарационного процесса вида полимераз из их многочисленных семейств, имеющих в клетке. Таким образом, белок p21WAF1 относится к белкам клеточного ответа на стресс.

Важность управления киназами особенно в случае опухолевого роста с помощью их ингибиторов расширили поиск белков, обладающих такими свойствами. Обнаружен ряд таких белков, которые составили два основных семейства — cip/kip1 и INK4. Данные изучения этих белков, особенностей их фосфорилирования, от которых зависят субклеточная локализация, характер белково-белковых взаимодействий и стабильность этих белков, представлены в работах [2, 3].

К первому семейству относятся белки p21, p27 и p57, ко второму — p16, p18, p19. Ингибиторы первого семейства угнетают все циклинзависимые киназы, ингибиторы второго семейства узнают лишь Cdk4/6, взаимодействующую с циклином D. Характер регуляции клеточного цикла с помощью комплексов Cdk—циклин и ингибиторами Cdk показан на рис. 6.2. (В последнее время установлена важность этих белков для клетки не только в связи и с их свойством ингибировать киназы и отвечать за доставку комплекса Cdk4,6/D в ядро, но и оказывать влияние на целый ряд процессов: готовность к апоптозу, регуляцию транскрипции, способность клетки к миграции, морфологические изменения цитоскелета. Функция этих белков связана с местом их локализации в клетке и временем их жизни [2, 3].)

Изучение мутантов, действие низких доз рентгеновского облучения на которые приводит к остановке клеточного цикла, позволило установить следующее. Возможно существование двух типов таких мутантов. Одни задерживают прохождение фаз цикла лишь на какое-то время, а затем возобновляют его. Другие никогда не возобновляют цикл и умирают. При этом в первом случае оказалось, что если до задержки цикла в ДНК выявляются многочисленные повреждения, то после возобновления цикла они исчезают. Это привело к понятию о существовании своеобразных контрольных пунктов с участием соответствующих молекулярных комплексов клетки — чекпойнтов, наделенных способностью останавливать клеточный цикл с целью проверки правильности его прохождения и целостности генетической информации, предназначенной для эквивалентного распределения потомству. Первым таким пунктом и является описанная выше проверка генома на целостность, происходящая на границе фаз G₁ и S. Это чекпойнт G₁, или рестрикционная точка (в случае дрожжей — фаза старта). Ясно, что работа контрольного пункта связана с установлением отсутствия или наличия повреждений в ДНК, передачей информации, полученной при этой проверке, тем механизмам, которые отвечают либо за завершение цикла либо за его остановку. Это можно выразить терминологической триадой сенсор—сигнал—эффектор. (Чекпойнты осуществляются и на последующих стадиях цикла [4].) Кратко охарактеризуем данные изучения компонентов этой триады.

Сенсоры повреждений в ДНК являются наименее изученной областью. В настоящее время внимание к исполнению этой роли привлечено к таким белкам, которые не принимают участия в

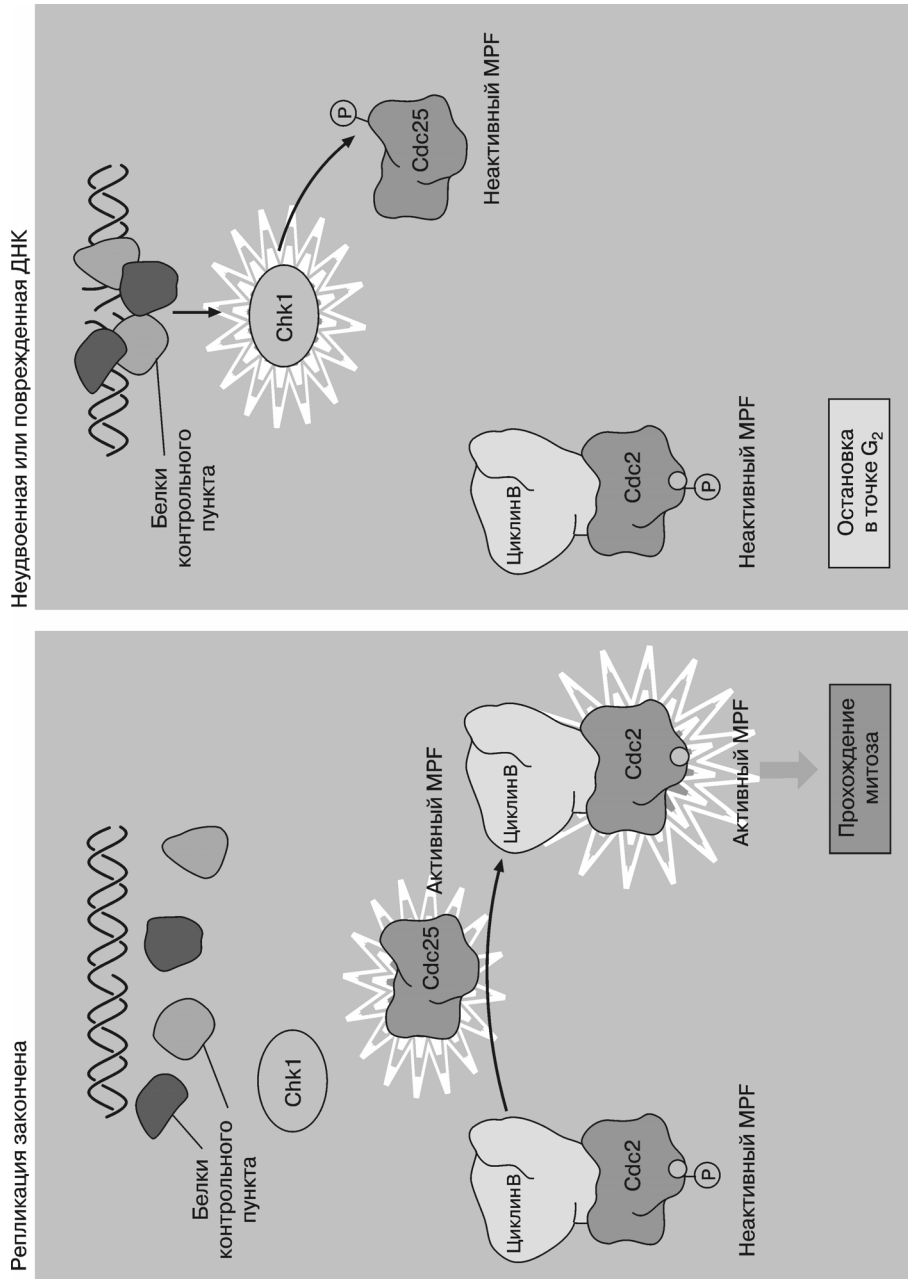
репликации ДНК и тем не менее очень похожи на эти белки. Считается, что они также могут образовывать комплексы, способные двигаться вдоль ДНК (или протягивать ее через себя), очевидно, с целью обнаружения каких-то структурных аномалий [5]. В последнее время идентифицированы белки, составляющие комплекс MRN—Mre11/Rad50/Nbs1, способный воспринимать появляющиеся в ДНК разрывы в обеих ее нитях, привлекать к участкам повреждений, а также индуцировать активность ферментов, принимающих меры для ликвидации этих повреждений [6]. Недавно показано, что этот комплекс чувствует не только DSB (*double stranded breaks*), но и структурные аномалии в синтезе ДНК, приводящие к остановке продвижения вилки репликации. Более того, можно предположить возможность сенсорики не самого повреждения, а возникающего в его результате динамического изменения каких-либо элементов структуры ДНК, например в виде появления G-тетрады [7] и других структур, а также квантово-механических изменений, касающихся электронной природы структурно-динамической микрогетерогенности ДНК [8, 9].

Итак, клетка, «получающая разрешение» на прохождение цикла, должна быть абсолютно «здоровая» и не иметь какие-либо дефекты. Для этого функционируют ее контрольные пункты — чекпойнты. Считается, что они контролируют каждый шаг цикла, но в настоящее время наиболее изучены такие из них, как G₁—S, G₂—M (*mitotic checkpoint* — MPF — *mitosis promoting factor*) и комплекс, обеспечивающий прохождение анафазы — APC (*anaphase promoting complex*). Последний также называется чекпойнтом веретена (*spindle checkpoint*), или циклосомой из-за исключительной своей массивности (13 коровых каталитических субъединиц, плюс адаптерные и линкерные элементы).

При выявлении сенсорными механизмами дефектов на ранних стадиях цикла в поздней G₁-фазе происходит привлечение к местам повреждений и активирование за счет ауто- и трансфосфорилирования протеинкиназ двух типов — ATM и ATR [10]. Они составляют группу белков PIKK, родственных фосфоинозитид-3-киназе (PI3K). В эту группу входят также ДНК-зависимая протеинкиназа DNA-ПК, необходимая для репарации двойных разрывов ДНК по механизму соединения негомологичных концов, и чувствительная к действию рапамицина киназа mTOR, связывающая возможность протекания фазы G₁ с уровнем содержания в клетке питательных веществ и факторов роста.

Подробно эти ферменты описаны в обзоре [5]. (Особо следует отметить охватывающую всю данную область исследований курсовую работу М.В. Спивакова: «Онкогены и опухолевые супрессоры в регуляции G₁- и G₂-чекпойнтов клеточного цикла, контролирующие повреждения ДНК», М., 2001, широко представленную в Интернете.) Активацию киназ семейства PIKK следует считать инициацией формирования клеточного ответа на стресс, в котором они передают сигнал о появившемся в клетке дефекте эффекторным структурам. Важнейшими субстратами действия ATM- и ATR-киназ оказались такие эффекторные структуры, как киназы, которые активируются только во время чекпойнтов. Это чекпойнт-киназы Chk1 и Chk2 (рис. 6.4). Установлено, что субстратами их действия являются такие важные белки, как онкосупрессор p53 — «сторож» целостности генома. Затем это белки BRCA (1 и 2), участвующие в репарации ДНК, а также различные типы фосфатаз (cdc25 A, B и C), от активности которых зависит поведение соответствующих молекулярных исполнителей клеточного цикла, и, очевидно, такая киназа, как Wee1. (Она важна для инактивации стартовых Cdk, фосфорилируя их по Tyr15.)

Поскольку мутации гена Chk1 летальны, лучше всего изучена киназа Chk2 [11]. Итак, при возникновении повреждения в ДНК активируются стрессовые киназы ATM и ATR, которые фосфорилируют киназу Chk2, активируя ее. Она же в дополнение к работе ATM и ATR фосфорилирует белок p53 еще и по другим сериновым остаткам. В результате этого молекулу p53 перестает узнавать фермент системы убиквитиновой деградации белков убиквитинлигаза MDM2 и такая активизированная молекула p53 приобретает способность выступать транскрипционным фактором, узнавая специфическую регуляторную последовательность и определяя экспрессию десятка различных генов, отвечающих за жизнь клетки или ее смерть. Однако для этого важно, чтобы с помощью фосфатаз дефосфорилировался С-конец белка p53, который узнается специальным семейством белков, называемым 14-3-3σ. С их помощью создается такая конформация этого конца, при которой становится возможным ацетилирование лизинов С-конца. И вот во избежание каких-либо случайностей в судьбе клетки только такая молекула, прошедшая все сложные этапы модифицирования N- и С-концов, начинает функционировать как специфический транскрипционный фактор, индуцируя среди прочих генов активность такого, как отмечено выше,



важного гена, как p21WAF1. Вместе с тем установлена способность p53 снижать скорость транскрипции таких генов, как Cdk1, циклина В и Cdc25C. Это — важнейшие исполнители G₂-фазы митоза и, таким образом, остановка цикла в G₂ зависит от активности «геномного стража». Более того, известно, что p53 активирует экспрессию генов, кодирующих белок 14-3-3σ, являющийся ингибитором Cdk1, а также чувствующий стресс белок GADD45, функционирующий как ингибитор Cdk1/циклина В и вместе с тем как активатор белка p21WAF1, и взаимодействующий с такими белками, как PCNA, MEKK4, p38 [12]. Вот такое детальное изучение активности молекулы p53 привлекает внимание в связи с поиском средств эффективного подавления активности этой молекулы при раке.

Помимо белка p53 субстратами Chk2 являются такие регуляторы клеточного цикла, как фосфатаза Cdc25C и белок — опухолевой супрессор BRCA1 и 2, с нарушениями в работе которого связан наследственный рак груди. Указанные белки важны для успешного осуществления процессов репарации ДНК, но при этом они не связываются с ДНК, а влияют на процесс транскрипции, взаимодействуя с транскрипционными факторами. Детали этого взаимодействия изучаются [12].

Таким образом, киназа Chk2 наделена способностью создавать регуляторы клеточного цикла за счет фосфорилирования своих субстратов в зависимости от сложившейся в клетке ситуации, либо активируя, либо инактивируя функцию, в которой участвуют эти субстраты и таким способом останавливать протекание цикла.

В настоящее время полагают, что киназа Chk1 причастна к осуществлению чекпойнта в S- и G₂-фазах [13]. Поскольку считается, что в злокачественных клетках чекпойнт G₁ не работает, то ингибирование киназы Chk1 и, следовательно, отмена чекпойнтов S и G₂ должны резко снизить эффективность репарационных процессов в раковой клетке, чем уменьшить ее выживаемость, что и наблюдалось в эксперименте [14]. Изучению принципов поиска эффективных ингибиторов киназ чекпойнта посвящена работа [15].

◀ **Рис. 6.4.** Контроль G₂-чекпойнта, осуществляемый с помощью киназы Chk2 [The Cell: A Molecular Approach. — 2nd ed. / Ed. by G.M. Cooper. — Sunderland (MA): Sinauer Assoc., 2000]

Основные субстраты действия киназы Chk1 — фосфатазы Cdc25 A и C, фосфорилирование которых приводит к распаду этих ферментов и невыполнению их функции (см. рис. 6.3). Неспособность дефосфорилирования Cdk1 по Thr161 нарушает взаимодействие этой киназы с циклином B, что и останавливает прохождение цикла в фазе G₂. Считается, что субстратом действия Chk1 является также киназа Wee1, которая в активированной форме фосфорилирует Tyr15 киназы Cdk1 так, что она перестает работать. Следовательно, киназа Chk1 также функционирует как двойной замок, закрывающий ворота на пути прохождения клеточного цикла.

Итак, в клетке выявляются такие молекулярные взаимодействия, которые могут быть представлены осью: ATM/ATR—CHK1/CHK2—CDC25—CDK, подробно охарактеризованной в обзоре [16].

Как же происходит остановка клеточного цикла в чекпойнтах G₁ и G₂? Кратко подытожим имеющуюся информацию.

Поскольку в фазе G₁ осуществляется подготовка к удвоению генома клетки и экспрессия необходимых для этого генов определяется активацией специальной транскрипционной системы E2F—DP, то ясно, что такая задача может быть решена с помощью механизмов двух типов. Один из них основан на запрете активации системы E2F—DP, другой тип не связан с этой системой.

Как отмечено выше, активность E2F—DP сдерживается взаимодействием с белком pRb, при фосфорилировании которого с помощью комплексов Cdk4/6—циклин D и Cdk2—циклин E эта транскрипционная система освобождается от пут белка pRb и может работать. Следовательно, остановка цикла в G₁ должна быть связана с инактивацией комплексов Cdk4/6—циклин D и Cdk2—циклин E. Показано, что повреждения ДНК приводят к быстрой деградации циклина D. Таким образом, фосфорилирование pRb не происходит и E2F—DP не активируется. Более того, при распаде комплекса с циклином D происходит освобождение из этого комплекса таких белков, как киназные ингибиторы семейства Cip/Kip. Они сразу же связываются (еще изучается как) с комплексом следующего шага цикла Cdk2—циклин E и инактивируют его. Инактивацию этого комплекса вызывает и такой сильнейший ингибитор киназ, как белок p21Waf1, суперэкспрессируемый при повреждениях ДНК за счет активации белка p53 как транскрипционного фактора гена этого ингибитора. Помимо указанных средств, сдерживающих цикл в фазе G₁,

природа использует и такое средство, как инактивация фосфатазы Cdc25 A. В ее задачу входит удаление фосфатной группы с Tyr15 (вносимого киназой Wee1), что необходимо для активации Cdk2-киназы. При повреждениях ДНК чекпойнт-киназа Chk1 фосфорилирует эту фосфатазу, что разрушает ее и лишает возможности активировать комплекс Cdk2—циклин E [15]. Если мы говорили об используемых природой двойных замках, охраняющих ход клеточного цикла, то для его остановки в фазе G_1 используются и тройные замки как средства надежности системы, позволяющей нивелировать эффекты случайных ситуаций в клетке. Более того, сам «страж генома» белок p53 при активации в результате возникновения в ДНК повреждений способен связываться с комплексом E2F—DP, блокируя его активность, а также снижать скорость транскрипции белков DP, а отсюда и эффективность работы E2F—DP в целом.

Задержать протекание клеточного цикла в G_1 независимо от активности транскрипционного фактора E2F—DP можно еще двумя способами: запретить синтез необходимых для этой фазы циклинов и инактивировать ДНК-полимеразу δ , создающей в S-фазе полную реплику генома. Что касается первого способа, то оказалось, что белок pRb, от состояния фосфорилирования которого зависит активность E2F—DP, обладает способностью связываться с ферментом, контролирующим уровни модификаций аминокислот в гистонах — гистондеацетилазой HDAC1 и комплексом белков SWI/SNF, ответственным за расположение нуклеосом и возможность динамических изменений в хроматине, а отсюда и активности соответствующих генов. При наличии в клетке комплекса pRb—HDAC1—SWI/SNF синтез циклинов E и A репрессирован и может быть активирован только при распаде этого комплекса, что и происходит при фосфорилировании pRb. Таким образом, при повреждениях ДНК, вызывающих быстрый распад циклина D и отсутствие фосфорилирования pRb, синтез циклинов следующих шагов цикла репрессирован, и ход цикла в фазе G_1 будет остановлен. Это же произойдет, когда белок p21WAF1, способный к взаимодействию с C-концом такой субъединицы ДНК-полимеразы дельта, как PCNA нарушит работу главного репликативного фермента, и это также «заморозит» клеточный цикл в данной точке.

Итак, пройдя через G_1 - и S-фазы цикла деления, клетка должна еще раз подвергнуться проверке на целостность всех ее

систем и ее готовности вступления в митоз. Эта задача и возложена на G₂-чекпойнт. Основная молекулярная стратегия осуществления проверки на этом этапе состоит в регуляции активности комплекса Cdk1—циклин В, отвечающего за вступление клетки в митоз. Как инактивируется этот комплекс? Ранее было отмечено, что при появлении в ДНК повреждений активируются стрессовые киназы ATR и ATM, которые фосфорилируют и активируют чекпойнт-киназу Chk1. Ее эффекторными молекулами являются киназа Wee1, которая при фосфорилировании активируется и вносит фосфатную группу в Tyr15, что инактивирует киназу Cdk1. Более того, Chk1 фосфорилирует также фосфатазу Cdc25 C, и это ее уничтожает так, что ни одна фосфатная группа не снимается с киназы Cdk1, она остается полностью неактивной и клеточный цикл далее не продвигается (см. рис. 6.3). Изучаются и другие механизмы остановки цикла в G₂-фазе, связанные с активацией ингибиторов компонентов работающего комплекса, с возможностью перекрытия их транспортировок в ядро и секвестраций (обособлений) в цитоплазме, а также блокированием процессов, приводящих к диссоциации ядерной оболочки.

Следующий пункт проверки на отсутствие нарушений в клетке — чекпойнт веретена (*spindle checkpoint*) — ставит перед собой цель установить правильность расположения на экваторе клетки двух наборов хромосом, каждый из которых предназначен для образующихся дочерних клеток. Устанавливается также правильность прикрепления хромосом к микротубулиновым нитям веретена, правильность организации полюсов делящейся клетки и функционирования центросом аппарата ее деления. Необходимо, чтобы кинетохоры (специальные хромосомные белковые комплексы, расположенные в районе перетяжек хромосом — центромер) всех хромосом были прикреплены к нитям веретена. При этом из-за ориентации расхождения этих структур к противоположным полюсам клетки создается напряжение. Оно и завершенность прикрепления кинетохор к веретену воспринимаются как норма. Нарушение же этих процессов генерирует сигнал чекпойнта веретена, останавливающего входение клетки в стадию анафазы. За это входение отвечает специальный, содержащий особенно большое число субъединиц белковый комплекс, получивший название APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*). Оказалось, что этот комплекс является убик-

витинлигазой (ферментом класса E3 убиквитинового пути деградации белков) [16]. Таким образом, в регуляции клеточного цикла принимают участие такие регуляторы, которые определяют время жизни соответствующих белков в клетке и отвечают за процессы их деградации. Если эти белки по каким-то причинам из клетки не удаляются, то это приводит к остановке цикла и поднимает вопрос о ее жизни и смерти. В настоящее время известно, что основной активатор APC/C — белок Cdc20 [17]. При его активности происходит узнавание содержащегося в циклине В «участка разрушения» (D-box — *destruction box*). При разрушении этого циклина APC/C лишается своего сдерживающего начала и атакует такой субстрат, как белок секурин (*securin*). Этот белок ингибирует специальную протеазу — сепаразу, что сдерживает преждевременное расхождение хроматид и только при разрушении секурина с помощью убиквитизации и снятия секуринового блока сепараза выполняет этот процесс, разрушая молекулы слипания хроматид — когезина (*cohesin*). Следовательно, включать и выключать APC/C можно с помощью Cdc20 потому, что оказалось, что такой белок, как Mad2 связывается с Cdc20, инактивируя активность последнего. При исправлении дефектов митотического чекпойнта Mad2 освобождает Cdc20 и APC/C активируется. Таким образом, Mad2 относится к классу белков, представляющих собой митотические регуляторы и в настоящее время известно несколько таких белков — Mad1, Bub1-3, Rae1 [18, 19].

Итак, протекание внутриклеточных процессов, развивающихся на основе генетической информации клетки, обязательно использует принцип проверок, чекпойнтов правильности выполнения отдельных этапов и всего процесса в целом, что позволяет сделать правильный выбор в определении судьбы клетки в сложившейся ситуации: должна ли реализовываться в клетке программа выживания или запрограммированная ее смерть. Выше мы рассматривали работу блоков генов и сети сигнальных путей, обеспечивающих выживание клетки, здесь же кратко охарактеризуем широко описанные в литературе внутриклеточные молекулярные пути и способы их активации, которые отвечают за уничтожение дефектных по ряду причин клеток из их многомиллиардного сообщества в организме. Это уничтожение получило название апоптоз, который природа наделила важной регуляторной функцией поддержания баланса на уровне тканей

и органов. Так, во взрослом организме благодаря апоптозу ежедневно идет замена до 70 млрд клеток новыми (из приблизительно 100 трлн клеток взрослого организма [20]), а пальцы рук и ног представлены на конечном этапе развития разделенными структурами благодаря апоптозу клеток, соединяющих их первоначально в единое целое. Апоптоз важен для образования любых отверстий, необходимых организму. Более того, благодаря апоптозу выполняется задача по очистке организма от инфицированных клеток как источника распространения инфекции. Ясно, что сбои в работе системы апоптоза — причина многих патологий, включая рак и нейродегенеративные заболевания. Применение цитостатического лекарства также автоматически поднимает вопрос о возможности и эффективности активации системы апоптоза, суть которого рассмотрим в следующей главе.

О РАБОТЕ СИСТЕМЫ АПОПТОЗА, НЕКРОЗА И АУТОФАГИИ КЛЕТКИ

Как возникло понятие об апоптозе? С самых ранних шагов изучения клетки было известно, что нанесение ей различных физических травм ведет к ее разрушению и гибели, получивших название некроза. Но при сканировании обычных здоровых тканей выявлялись клетки, резко отличающиеся по морфологии, а также по биохимическому содержанию от подавляющей массы здоровых клеток. При изучении таких клеток, мембраны которых образовывали наблюдаемые характерные выпячивания, а ДНК претерпевала характерную фрагментацию в виде образования фрагментов регулярного размера, оказалось, что в таких клетках активируются специальные протеазы, которые разрушают белки, разрезая пептидную связь по цистеиновым и аспарагиновым остаткам. Эти обнаруженные первоначально в лаборатории Robert Horvitz [1] (см. также [2, 3]) ферменты получили название каспаз (от *cysteine* и *aspartic acid proteases*). Многочисленность этой группы ферментов отражают присвоенные им цифры, превосходящие число 10. Раскрытие каскадного механизма активации этих ферментов и эффекторных, или исполнительных, функций соответствующих молекул, последствий их действия и биологического значения и позволило раскрыть суть запрограммированной клеточной смерти, получившей название «апоптоз» (по предложению профессора греческой филологии James Cormack).

Система апоптоза включается с помощью как внешних, так и внутриклеточных сигналов, возникающих в различных ситуационных состояниях клетки и передающихся соответствующим эффекторным структурам. В восприятии внешних сигналов основополагающую роль играет путь запуска апоптоза, начинающегося с активации рецептора, относящегося к семейству TNFR — фактора некроза опухоли TNF. К этому же семейству относится рецептор Fas R, узнающий факторы смерти, или лиганд Fas L (рис. 7.1).

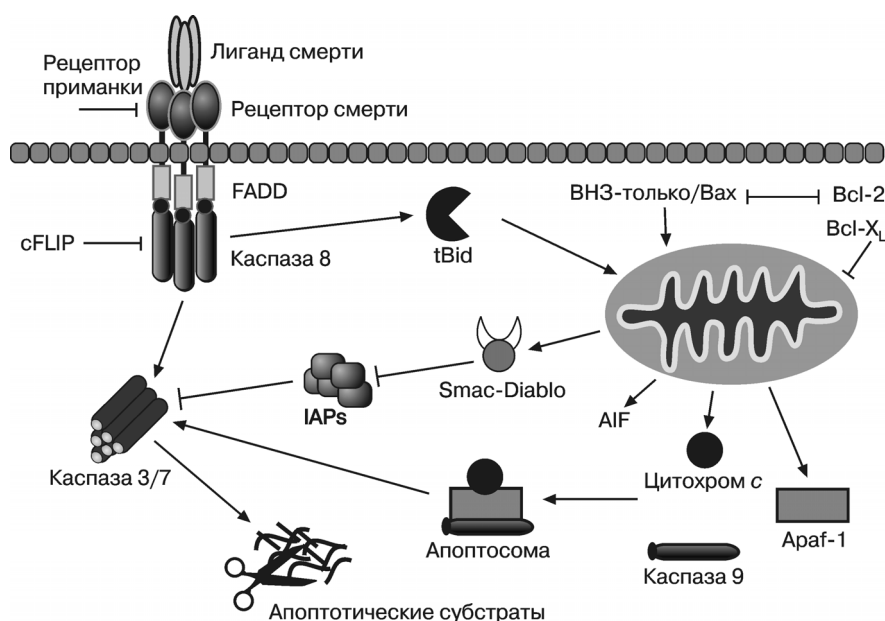


Рис. 7.1. Схема запрограммированной смерти клетки (PCD — *programmed cell death*) [4]. В левой части рисунка показан запуск PCD через активацию рецептора смерти за счет тримеризации белка CD95, образующего с ним устойчивый комплекс. Он рекрутирует с помощью адапторной FADD-молекулы прокаспазы 8. Активацию каспазы 8 может превращать молекула сFLIP. В правой части рисунка показана активация PCD с участием митохондрий. Центральным игроком этого пути являются белки семейства Bcl-2, включающие проапоптотические белки Вах и Bid, и антиапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-X_L. На этом пути апоптоза митохондрии выделяют такие молекулы, как цитохром с, факторы AIF, Араф-1, Smac-Diablo и, возможно, другие. Цитохром с связывается с Араф-1 и каспазой 9, образуя апоптосому. На уровне активации каспазы 3 эти два пути PCD объединяются. Активации каспазы 3 противостоят белки IAP, которые подавляются белками Smac-Diablo. Активация каспазы 3 определяет активацию последующих каспаз, которые и разрушают клетку. Белок Bid отвечает за связь двух путей PCD. Его разрушает каспаза 8 так, что он перемещается в митохондрии, усиливая выход цитохрома с, что превращает апоптоз в неизбежность

Фактор TNF образуется в клетках активированных макрофагов и служит эффективным внешним средством запрограммированного уничтожения тех или иных клеток. Связывание этого фактора с рецептором отвечает за ассоциацию данного комплекса с мембранными белками, содержащими так называемый домен смерти, выявляющийся соответственно в молекулах TNF и

Fas. Эти мембранные белки называются соответственно TRADD и FADD (TNFR и Fas — *associated death domain protein*). При функционировании доменов смерти активируются инициаторные каспазы. По нагрузке этих молекул в осуществлении процесса апоптоза они делятся на две группы: инициаторных и эффекторных, или исполнительных, ферментов. Задача первых состоит в запрограммированном запуске последующих этапов апоптоза, задача вторых — разрушение клетки. В осуществлении апоптотической функции клетки важнейшую роль играют митохондрии. Белки апоптотического пути способны продырявливать их, и из них вытекают белки (SMAC), которые связывают белки, предотвращающие апоптоз, — IAP-белки. Более того, при нарушении проницаемости митохондрий из них также вытекают такие молекулы, как цитохром *c*, который связывается со специальной протеазой клетки — Араф-1 и АТФ, образуя комплекс с прокаспазой 9. Этот комплекс получил название апоптосомы. Ее задача — активация прокаспазы 9 до функциональной формы, в которой зрелая каспаза 9 узнает и активирует эффекторную каспазу 3 (рис. 7.1) [4]. (Недавно было показано, что Fas-индуцированный апоптоз также возможен в результате отрезания С-концевой половины кодируемой митохондриальным геномом молекулы цитохрома *b*, и поступления ее в цитоплазму [5].)

При организации системы апоптоза клетки обращает на себя внимание использование принципа не только инициаторных активаций и функционирования исполнительных структур, но и принципа сбалансированности средств, способствующих как успешному осуществлению этого явления, так и его запрету. Более того, моменту соединения лиганда смерти с рецептором смерти также предоставляется шанс неисполнения смертельного приговора клетки в виде использования рецептора-приманки, способного связывать лиганд смерти, но не активирующего белок FADD и путь апоптоза в целом. Не удивительно, что такая важная в определении судьбы клетки система, как апоптоз должна находиться под контролем собственного ингибитора. Эту функцию выполняет белок *c*-Flip. Оказалось, что в раковой клетке активность гена этого белка резко увеличивается, повышенное количество *c*-Flip подавляет проапоптотический путь клетки, блокируя рецептор DR5, который связывает лиганд смерти клетки TRAIL (*tumor necrosis factor — related apoptosis inducing ligand*). Выключение же этого гена с использованием молекул siRNA (*small interference RNA*, блокирующая трансляцию матрицы белка)

приводило к повышению чувствительности опухоли к действию химиотерапии [6].

Ясно, что описанное множество средств осуществления апоптоза также может служить цели максимизации биологического разнообразия. Из этого следует, что наиболее эффективной может быть лишь персональная медицина. Итак, жить ли клетке или умереть зависит от состояния апоптотических и антиапоптотических средств. Они — члены одного семейства белков Bcl-2, важных для биологии митохондрий в клетке. Такие белки, как Bax, Bid, Bak или Bad — это апоптотические белки, а Bcl-XL и Bcl-2 запрещают апоптоз. Считается, что Bcl-2 ингибирует белок, образующий канал для выброса цитохрома *c* из митохондрий. Но, очевидно, этот белок может делать что-то еще, так как он ингибирует апоптоз даже тогда, когда выброс цитохрома *c* уже произошел. (О важности персональной медицины свидетельствуют и клинические наблюдения, которые показывают, что если в раковой клетке много белка Bax, лекарство действует эффективно и эффект прямо противоположен в случае повышенных количеств белка Bcl-2 [4].)

В качестве мишени антираковой терапии под пристальным вниманием находится такой антиапоптотический белок, как сэвайвин (survivin). Он относится к белкам группы IAP (*inhibitors of apoptosis*). Мишенью его ингибирующего действия является каспаза 9 [7]. Поскольку ген этого белка репрессирован с помощью онкосупрессора p53 дикого типа, который чаще всего исчезает из раковых клеток, то в таких клетках идет сверхпродукция сэвайвина, что и исключает апоптоз злокачественной клетки. Имеются данные о роли этого белка в регуляции активности APC/C-комплекса клеточного цикла и возникновении хемоустойчивости. Оказалось, что функция сэвайвина зависит от его локализации в клетке: при локализации в цитоплазме апоптоз запрещен, а локализация в ядре делает клетку чувствительной к химиотерапии [8]. Следовательно, важно найти как ингибиторы этой молекулы, так и факторы, определяющие локализацию сэвайвина в клетке.

Как же организм освобождается от клеток, претерпевших апоптоз? Оказывается, на поверхности таких клеток появляется специальный маркер в виде молекул фосфатидилсерина. Эти молекулы, близкие по структуре к компонентам мембран, в нормальной клетке локализуются внутри нее, в апоптотической же клетке они перемещаются на ее поверхность и узнаются макрофагами, устраняющими такие клетки.

Что касается некроза (от греч. νεκρός — мертвый) клетки (и тканей организма), то это преждевременное насильное прекращение существования структур жизни в результате просто убийства клеток с помощью внешнего воздействия, несовместимого с жизнью.

Итак, характеризуя машинерию клетки, осуществляющую ее, как описано выше, запрограммированную смерть I типа — *programmed cell death type I PCD*, следует упомянуть о таком явлении, как самопоедание клетки, или аутофагия (*type II PCD*). Отличие между I и II типом заключается в том, что в первом случае для переваривания мертвой клетки используются ферменты лизосом фагоцитов, во втором же случае клетка переваривается собственными лизосомами. Подробнее об этом явлении можно прочитать в *Shintani T., Klionsky D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword // Science. — 2004. — 306, N 5698. — P. 990—995.* Здесь же укажем следующее.

При микроскопировании клеток, функционирующих в различных условиях, обнаружены внутриклеточные специальные образования, обособляющие двойным слоем мембран какую-то небольшую часть цитоплазмы и даже целые органеллы (при их дефектах или слишком высоком содержании в клетке). Эти образования получили название аутофагосом. Смысл их образования состоит в увеличении эффективности локальной работы лизосом за счет их физических слияний с аутофагосомами. Продукты аутофагосомного переваривания менее значительного для клетки материала могут использоваться ею в ужесточившихся условиях существования в качестве необходимого питания, а также в строительных целях, что служит делу выживания. Таким образом, аутофагия — это демонстрация принципа экономной организации живого и важный процесс рационализации функционирования клетки.

Как утрата или увеличение аутофагосомной функции отразится на судьбе клетки и возможного развития различных патологий? Изучение этого вопроса стало возможным в связи с обнаружением генов (*ATG7* и *beclin-1* и еще ~30 генов семейства *Atg*), активность которых определяет процесс аутофагии. Более того, японским исследователям удалось разработать надежную, чувствительную и достаточно простую модель изучения аутофагии на примере культуры клеток эмбриональных фибробластов мыши. У них и в материнской, и в отцовской хромосоме отсутствовал ген *Atg5* (генотип *Atg5^{-/-}*). Этот ген вводили в клетки в

виде плазмидной конструкции, в которой за возможность его экспрессии отвечал специальный промотор, содержащий такой структурный элемент, который способен связывать тетрациклин и тем самым блокировать экспрессию Atg5 [9]. Следовательно, при наличии тетрациклина ген Atg5 не экспрессируется и аутофагия не происходит, при удалении же антибиотика она становится возможной. Это упрощает изучение рассматриваемого процесса. За разработку этой экспериментальной системы профессор Нобору Мидзусима стал победителем конкурса молодых ученых на 32-м конгрессе FEBS в Вене в 2007 г.

Обобщая материал предшествующих глав, следует отметить, что цитотоксическое лекарство воспринимается клеткой как фактор стресса — стрессор. В настоящее время стресс связывают, прежде всего, с изменением характера укладки соответствующих макромолекул клетки, воспринимающей лекарство. Такое изменение может быть результатом соответствующей рецепции стрессора какой-либо структурой клетки или просто физико-химическим влиянием введенного лекарства на молекулы клетки. Хотя картина, показывающая набор клеточных стрессовых сенсоров, еще достаточно фрагментарна, в настоящее время успешному изучению поддаются сенсоры, чувствующие поломки в ДНК, и такие сенсоры ксенобиотиков, как обнаруженные сиротские ядерные рецепторы, способные модулировать активность генома в зависимости от сложившихся условий функционирования клетки. В задачу сенсора входит активирование соответствующих сигнальных путей, с помощью которых реализуется такая потенция клетки, как возможность усиления молекулярных средств, позволяющих ей либо выжить, либо прекратить свое существование. Таким образом, при действии цитотоксического лекарства, особенно мишенного типа, следует учитывать возможность активации молекул, обеспечивающих путь выживания клетки. Это и снижает эффективность действия применяемого лекарства. Усиление пути выживания клетки обусловлено активацией в условиях клеточного стресса соответствующих протеинкиназ. В настоящее время изучена такая последовательность каскадного функционирования этих ферментов, которую можно представить в виде порядка «сверху вниз». Ясно, что клетку можно лишить шанса на выживание при действии цитотоксического лекарства, если разрушить «верх» сигнального пути ответа клетки на стресс. Однако взаимодействия в клетке при передаче стрессового сигнала отличны от простых линейных отношений

и, очевидно, представлены сетью с возможными различными разветвлениями. Это требует специального изучения возможности фармакологического контроля над активацией основного пути выживания клетки.

Особую роль в ответе клетки на стресс играет эндоплазматический ретикулум (ER). Появление в этом компартменте клетки белков с нарушенной укладкой генерирует сигнал тревоги, надежно распространяющийся, как описано выше, тремя независимыми способами. Таким образом, ER выступает и как сенсор стрессового состояния клетки, и как контрольный пункт молекулярного порядка в клетке. Значение сигналов, возникающих в ER, состоит в том, что под действием этих сигналов активируются те гены, продукты которых способны исправлять дефекты в способе укладки белков. Однако при катастрофических нарушениях в процессе стресса организации белковых молекул сигналы ER активируют гены, активность которых обрекает клетку на самоуничтожение. Таким образом, при действии цитотоксического лекарства выигрышной является ситуация содержания в ER белков с нарушенной укладкой. Поскольку такие белки устраняются с помощью убиквитиновой метки и последующей протеасомной их деградации, то при использовании цитотоксических лекарств, очевидно, эффективным может быть прием замедления этих процессов с помощью одновременного использования с адресной доставкой в организме фармакологических средств, влияющих на работу убиквитиновой системы деградации белков. Итак, применение мишенного лекарства одновременно с ингибиторами протеасом может увеличивать эффективность медикаментозного лечения. Поистине открывается широкое поле перспектив в молекулярной медицине.

Вызываемое действием цитотоксического лекарства состояние клеточного стресса способно обусловить изменения в картине активности регуляторов клеточного цикла. Роль таких белков, как pR B, p53, p21WA F21, Cdc25 A, Wee1, Cdc20, Mad2, секурина, сепаразы, когезина широко известна. В последнее время в регуляции клеточного цикла выявляется особо важная роль чекпойнт-киназы Chk1, ответственной за прохождение G₂/M-чекпойнта и вхождения клетки в митоз. В случае раковой клетки, проходящей G₁-стадию цикла без контроля, важно ингибирование этой киназы. Это повышает шансы на устранение клетки из организма, так как чувствительность раковой клетки к действию применяемой химиотерапии, как уже отмечено, повышается. Сле-

довательно, эта киназа представляет собой перспективную модель для поиска фармакологических средств, способных улучшить эффективность используемой химиотерапии.

Чрезвычайно широкие исследования проводятся в области изучения систем запрограммированной смерти клетки, представленной апоптозом и аутофагией. Ясно, что в случае рака особенно необходимо активировать эти системы и усилить процессы их работы. Один из подходов на этом пути связан с изучением белков, ингибирующих апоптоз, — сэвайвина и других IAP-белков. Перспективность такого подхода демонстрирует тот факт, что, как указывалось, блокирование белка с-Flip, ингибирующего рецептор смерти клетки Fas, успешно направляет клетку по пути апоптоза. Следовательно, с-Flip — еще одна мишень для поиска перспективных антираковых лекарств.

Сложность системной организации клетки поднимает вопрос о важности в сопряжении картины геномной активности и возникновения хемотройчивости действия таких регуляторов геномной активности, как открытые в последнее время микроРНК (miRNA). Характеристике этих регуляторов и их роли в возникновении лекарственной устойчивости посвящена следующая глава.

О РОЛИ микроРНК В ВОЗНИКНОВЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

В главе 8 мы раскрываем биологическое значение работы такого регуляторного механизма клетки, который основан на функционировании специального класса молекул, названных микроРНК, или miRNA (miR). Кратко рассмотрим, как были открыты эти молекулы, как они функционируют, какую роль они играют в жизни клетки и как они ведут себя при развитии в клетке стресса, вызываемого в том числе действием цитостатического лекарства. Поскольку в клетке обнаружены самые разные низкомолекулярные некодирующие РНК, важно описание особенностей структуры и функционирования в клетке такого класса молекул РНК, как miRs. Молекулам miRs посвящен ряд специальных обзоров [1—11]. Здесь отметим следующее.

Эру молекулярной биологии открыло обнаружение отвечающих за наследственные признаки клетки молекул ДНК и установление их структуры. Вслед за этим было обнаружено, что нуклеиновые кислоты клетки представлены молекулами не только ДНК, но и РНК. Изучение структуры и функции этих молекул позволило установить основные закономерности устройства и значение нуклеинового мира в биологии. С первых же шагов исследований выяснилось, что РНК делится на два больших класса высоко- и низкополимерных молекул и при всей причудливости укладки на отдельных своих участках представляет собой полимер, в основном, в виде одной цепи. Молекулы РНК также делятся на кодирующие и некодирующие, представленные преимущественно низкомолекулярными видами snRNA (*small non-coding*). Если организация молекулы ДНК в виде двух комплементарных цепей позволяет выполнять задачу и вместилища генетической информации, и передачи ее поколениям, то может ли РНК, считываемая с различных областей генома и даже одновременно с двух нитей ДНК одного и того же участка [12], также образовывать двуцепочечные молекулы? Должна ли такая ситуация наносить клетке вред из-за появления матриц в схлопнутом и неактив-

ном состоянии? Более того, молекулу РНК, которая всегда должна связываться с какими-то молекулами, отличает высокая мобильность конформаций, принимаемых этой молекулой в целом и ее разными частями. Это должна быть не просто «кувыркающаяся» молекула, эта молекула должна постоянно «корчиться и извиваться» так, чтобы в разных ее частях возникала своя специфическая укладка, которую и узнают ожидающие шанса возникновения нужной конформации специальные извлекающие информацию факторы, которые связываются с РНК [13]. Ясно, что в двуспиральной молекуле необходимый РНК динамизм затруднен, и такая молекула в клетке будет особо заметной. В связи с этим мог возникнуть вопрос о необходимости защиты клетки от появления молекул собственной клеточной РНК в двуспиральной форме. Это облегчало бы клетке задачу распознавания появления таких молекул, представляющих геномы соответствующих вирусов. Вопрос о роли двуспиральных клеточных РНК ждал своего решения.

Прежде всего, было замечено, что при попытке усилить природную окраску петунии за счет введения трансгена, представленного таким геном, который отвечает за образование пигмента, окраска не только не усиливалась, но напротив, исчезала вообще. Таким образом, не только не работал введенный трансген, но и переставал работать собственный эндогенный ген этого пигмента. Почему? Ответ был получен при исследованиях наблюдаемого различными авторами механизма умолкания генов на таком объекте молекулярной биологии, как микроскопический червь нематода.

Выбрав в качестве объекта исследования один из белков клетки мышечной ткани червя, авторы поставили цель найти условия, приводящие к умолчанию гена. Оказалось, что введение в клетки излишних количеств мРНК гена этого белка (условие для включения механизма обратной связи — *feedback regulation*), а также антисмысловой нити данной мРНК (условие стерического препятствия функционирования матрицы) не вызывает искомого эффекта. Введение же этой матрицы в двуспиральной форме, представленной одновременно как смысловой, так и антисмысловой нитями, приводит к резкому подавлению экспрессии гена, к его умолчанию (*silencing*) [14]. За эту работу А. Fire и С. Mello были удостоены Нобелевской премии в 2006 г. Создавалось впечатление, что природа не любит dsRNA и тщательно контролирует ее присутствие в клетке с помощью каких-то средств самого быст-

рого реагирования. Действительно, необходимость выработки таких средств в природе оправдывается в связи с угрозой вторжения в клетку многочисленных вирусов, геном которых представлен dsRNA, а также слишком высокой интенсивностью перемещений мобильных элементов в геномах. Ранее был установлен интерфероновый механизм (PKR-ответ) защиты клетки от dsRNA. Оказалось, что dsRNA активирует специальную киназу PKR, которая при связывании такой РНК за счет активации STAT-сигнального пути индуцирует собственный синтез. Активированная PKR фосфорилирует малую субъединицу фактора инициации трансляции eIF2 α так, что он теряет активность, и процесс трансляции тормозится. При этом в клетке накапливается 2'–5'-полиадениловая кислота. Она активирует специальную молекулу — неспецифическую РНКазу L, способную бороться с появлением в клетке ненужной РНК. Эта система защиты клетки от интервенции двуспиральных РНК реагирует на такие из них, которые имеют достаточно большую протяженность [15].

Однако при изучении феномена умолкания гена было показано, что такая малая часть введенной в клетки dsRNA, как участок размером 21–23 п. н. способна вызывать эффект сайленсинга на основе механизма, отличного от действия интерферона [16]. РНК, способная вызывать эффект умолкания генов с помощью особого механизма, который удалось расшифровать, получила название интерференционной РНК (RNAi), а ее активное начало в виде куска размером 21–22 п. н. названо малой интерференционной (*small interference* — siRNA) РНК—siРНК. (Иногда используются названия *short interfering RNA* и *silencing RNA*.)

Открытие интерференционных свойств dsRNA было сделано на основе манипуляций с экзогенными молекулами и, естественно, возник вопрос о возможности существования специального механизма использования клеткой эндогенных, кодируемых геном малых молекул двуспиральных РНК. Факт существования таких кодируемых геномом молекул впервые обнаружен [17] на таком объекте исследований, как нематода. Позднее пришло понимание функциональной важности в жизнедеятельности клетки этого класса молекул, и они были названы микроРНК [18].

Оказалось, что RNAi обуславливает умолкание гена, используя тот же клеточный механизм действия, который функционирует и на основе miРНК, после того, как она пройдет этап обработки в ядре и поступит в цитоплазму. Эту общность определяет, прежде всего, исходная активация такой РНКазы, как эндо-

нуклеаза семейства РНКазы III, получившая название *Dicer*. При функциональной нагрузке этого фермента в клетке формируется специальный комплекс белков, получивший название RISC — *RNA-induced silencing complex*. В его обязанность входит взаимодействие с продуктами действия *Dicer* так, что комплекс способен выбрать одну из нитей двуспирального продукта, называемую нитью-гидом (*guide strand*), в то время как другая — пассажирская нить (*passenger strand*), в основном, деградирует. В качестве нити-гида чаще всего используется антисмысловая нить. Комплекс RISC, нагруженный такой нитью, способен отыскать в клетке соответствующую матрицу и посадить свою ношу на нее в область комплементарности. При этом если комплементарность оснований на участке взаимодействия совершенна и любая неспаренность оснований отсутствует (что характерно для растений), то активируется РНКазная активность соответствующих белков (*argonaute*) этого комплекса. Это вызывает деградацию матрицы. Если же нарушение комплементарности пар нуклеотидов имеет место (что характерно для miРНК животных), то матрица не может транслироваться и обособляется в клетке в виде таких структур, как Р-тела. Таким образом, умолкание гена связано с инактивацией его матрицы. Такова вкратце общая схема работы интерференционного механизма, в которой для простоты изложения многие важные детали опущены.

Преследуя цель обобщения данных изучения роли miРНК в возникновении хемоустойчивости клетки, охарактеризуем ядерный этап созревания этих молекул, определяющий образование из их первичных транскриптов таких продуктов, которые способны к функциональной деятельности. Детально этот этап описан в обзоре [4] с обобщающей схематической иллюстрацией процесса, который мы воспроизводим на рис. 8.1.

Гены miR, располагающиеся либо в межгенном пространстве, либо в интронах, либо в мобильных элементах транскрибируются с помощью РНК-полимеразы II (возможно использование в некоторых случаях pol III) в виде протяженной первичной РНК — pri-miRNA, которая даже может иметь кэп и поли-А-хвост как настоящая матрица. Вопрос о регуляции активности генов miR еще изучается. На этом пути привлекают внимание работы, в которых показано, что регуляция генов miR определяется состоянием гена «главного стража» целостности генома онкосупрессора белка p53. Действительно, когда изучили профиль miРНК из нормальной и раковой клетки мыши, лишенной гена

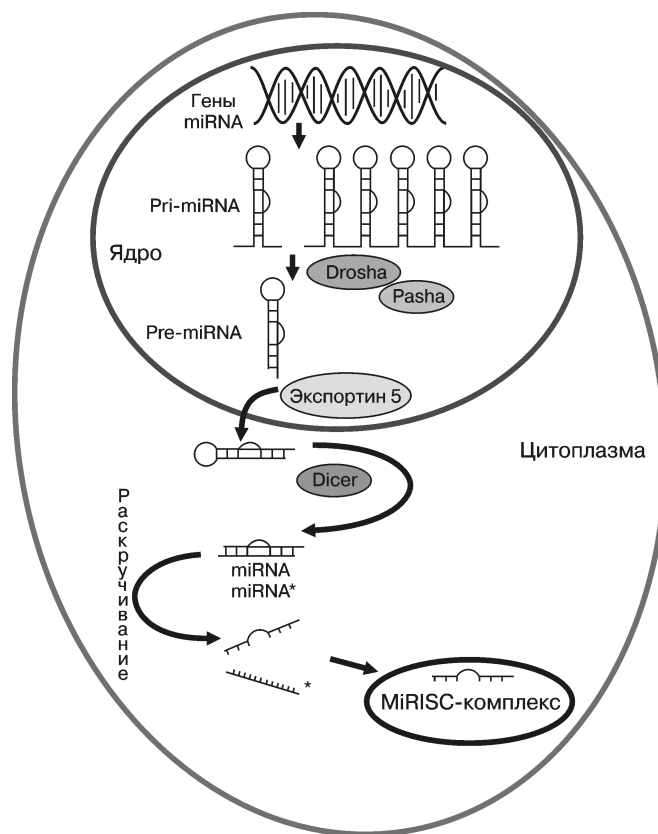


Рис. 8.1. Схема биогенеза miRNA [4]
Пояснения в тексте

p53 или нокаутированной по этому гену, то оказалось, что уровень синтеза молекул miРНК семейства miR-34 значительно снижен. Если же повысить уровень синтеза этих генов, клетки начинают включать систему апоптоза, и раковая опухоль перестает расти [19, 20]. Более того, в работе [21] показано, что клеточный белок с-Мус как онкоген, активирующийся в раковых клетках, особенно снижает синтез идентифицированных 13 miРНК. При введении таких молекул в клетки опухоли также наблюдается остановка ее роста. Таким образом, miРНК привлекают особое внимание как мощный фактор, определяющий интенсивность клеточной пролиферации.

Молекулы pri-miRNA узнаются и обрабатываются специальной РНКазой семейства III нуклеаз, называемой Дроша (Drosha). Она начинает действовать после того, как специальный белок, называемый Паша (Pasha), свяжет первичный транскрипт и предоставит его в распоряжение действия Дроша. Задача Дроша состоит в выщеплении из первичного транскрипта специальной шпильчатой структуры, содержащей небольшие участки неспаренности оснований и нехватку концевых 1—2 нуклеотидов с 3'-конца каждой нити дуплекса (рис. 8.1). Вот такая характерная результирующая структура размером в пределах примерно 70 п. н. получила название pre-miRNA. Ядерный этап созревания miR на этом заканчивается, образовавшаяся молекула узнается специальным транспортным белком экспортином и выводится из ядра в цитоплазму. Здесь она становится субстратом действия собранного на основе специальных белков-аргонавтов (*argonaute* — Ago) комплекса RISC, Dicer которого нарезает из pre-miRNA короткие (20—25 п. н.) двуспиральные нити: одна из них и является гидом, другая — пассажиром. Благодаря хеликазной активности комплекса RISC нити расходятся, пассажирская нить уничтожается (наблюдение исключений возможно). Нить-гид становится принадлежностью RISC, который с ее помощью определяет судьбу активности матрицы гена. Все зависит от места посадки нити-гида на матрицу. Если это происходит в области нетранслируемого 3'-конца матрицы и в комплементарном взаимодействии имеется *mismatch* — неспаренность оснований, то процесс трансляции будет подавлен, хотя матрица и сохранит свою целостность. В таком нетранслируемом состоянии она не исчезает из клетки, а со всеми работающими на ней компонентами образует специальные, обособленные от аппарата трансляции структуры, получившие название, как уже указывалось, *P*-тела (*processing bodies*). Детальному изучению *P*-тел посвящены работа [22] и обзор [23]. (Иногда встречаются названия для этих тел *GW*- и *Dcp*-тела.) Однако при посадке нити-гида в кодирующую область и образовании участка совершенной комплементарности (напомним, что чаще всего это обнаруживается у растений) индуцируется РНКазная активность комплекса RISC, что приводит к деградации матрицы. Таким образом, регуляция гена на уровне его экспрессии — лишь первоначальный этап процесса. На последующих стадиях он определяется активностью малых молекул РНК как эффективным инструментарием для необходимой оптимизации функционирования всей системы в целом. Действительно, смысл функциониро-

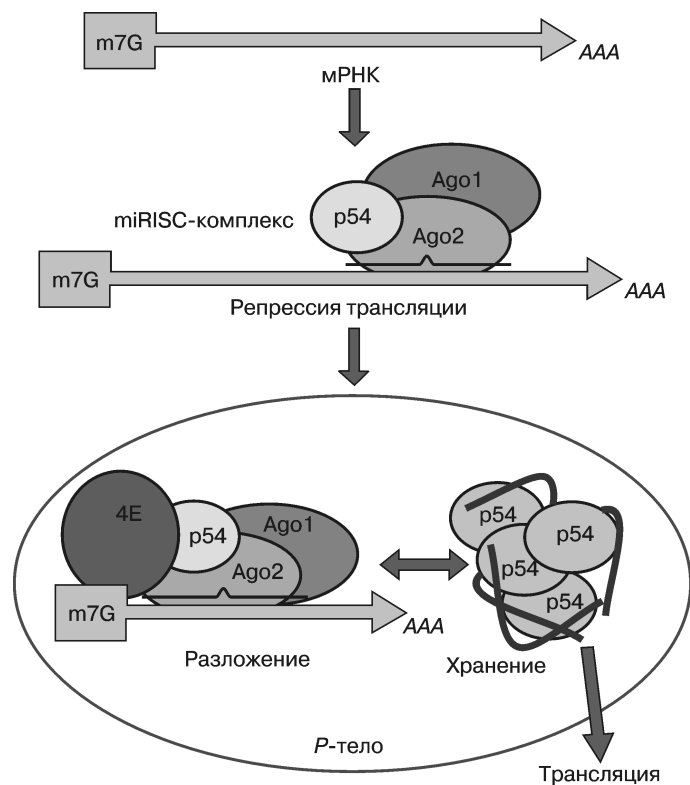


Рис. 8.2. Схема функционирования miR [4]
Пояснения в тексте

вания miR состоит не только в изъятии мРНК из обращения или ее «замораживании» на «депозите» клетки, но и в усилении активности этой мРНК в тех случаях, когда клетка в этом нуждается. Это возможно за счет того, что, связываясь с определенными участками матрицы, miR способны изменять ее конформацию так, что становятся доступными локусы, узнаваемые факторами, от которых зависит эффективность считывания матрицы (рис. 8.2).

Более того, если синтез белковых ингибиторов транскрипционных факторов может быть снижен с помощью молекул miR, то это также увеличит эффективность считывания матрицы. Появляются также работы, показывающие возможность активации экспрессии гена за счет взаимодействия miРНК (так называемой RNAa [24] и *small activating* — saRNA [25]) с промотором, что уве-

личивает его транскрипционную эффективность. Необходимость активации генов с помощью малой некодирующей РНК при развитии эмбрионов дрозофилы была показана в работе [26]. Запуск необходимого для следующей стадии развития эмбриона гена *Ultrabithorax* возможен лишь после того, как специальный белковый фактор Ash1 присоединится к специальным последовательностям генома TRE1 и TRE2, представленным элементами ответа гена *Trithorax*. За это присоединение и отвечают малые некодирующие РНК, и при их изъятии из клетки ген *Ultrabithorax* не активируется.

Итак, функционирующим в качестве эффективного инструментария включения и выключения функции того или иного гена в зависимости от сложившейся в клетке ситуации, молекулам miR необходима самая высокая степень разнообразия. Именно это и устанавливает эксперимент по клонированию индивидуальных молекул низкомолекулярной некодирующей РНК клетки с последующим секвенированием клонированной последовательности, а также методы идентификации miR на основе биоинформатики. Каждой идентифицированной молекуле miR присваивается свой номер и в настоящее время количество таких молекул выражается трехзначным числом.

Итак, способность молекул miR предотвращать трансляцию матрицы была установлена при изучении посттранскрипционной судьбы мРНК. Проявляются ли свойства miR на уровне транскрипции генов? Данные, полученные в последнее время, позволяют ответить на этот вопрос положительно. Установлено, что экспрессия генов, локализующихся в гетерохроматиновых участках генома, подавлена, а образование таких участков связано с химической модификацией молекул гистонов. Оказалось, что эти явления могут быть обусловлены активностью специальных, связанных с РНК белковых комплексов, которые получили название RITS (RNA — induced transcriptional silencing) (рис. 8.2). Отличительной особенностью этого комплекса является наличие не только белков типа *argonaute*, использующих как субстрат своего действия РНК, но и белков, содержащих хромодомены (*chromo-domain*), ответственные за метилирование гистонов, организацию хроматина и распределение гетерохроматиновых участков в геноме. На примере цепочечноделящихся дрожжей показано, что при нарушениях в комплексе RITS нарушается метилирование гистонов, образование центромер хромосом и блокируется клеточный цикл на стадии анафазы [27]. Однако возможен и прямо противополож-

ный эффект — усиление генной активности на основе miR и RITS [28]. В этой области исследований идет накопление результатов, необходимых для построения общей картины зависимостей, определяющих регуляцию генной активности с помощью miR.

Имеются ли какие-либо средства, с помощью которых можно влиять на активность самих miR? Функционирование этих молекул может быть подавлено при использовании специальных антисмысловых олигонуклеотидов, у которых молекула сахара заменена морфолиновым кольцом, а фосфатная связь остова полимера представлена фосфородиамидатом [Heasman J. Morpholino oligos: making sense of antisense? // Dev. Biol. — 2002. — 243, N 2. — P. 209—214]. Такие неприродные и инертные по своему влиянию на клеточные процессы соединения получили название морфолинов, или РМО (фосфородиамидат-морфолиновые олиго). Их сохраняющаяся способность комплементарного спаривания с участками природных нуклеиновых кислот, что обуславливает стерические препятствия при функционировании последних, служит полезным инструментом изучения свойств информационных молекул. Более того, очевидно, в природе были предприняты попытки защиты от эффектов действия двуспиральной РНК, появляющейся в клетке. В пользу этого представления говорит установленный механизм изменений в последовательностях dsRNA, называемый РНК-редактированием (см. обзоры [29, 30]). В клетках эукариот был обнаружен фермент аденозиндеаминаза (ADAR), который превращает аденозиновые нуклеотиды в инозины, что обозначается как A→I editing [31—34]. Следовательно, на dsRNA могут работать и Dicer, и ADAR. Если они находятся в конкурентных отношениях, то выигрыш бывает на стороне ADAR, так как A→I-редактирование установлено в случае молекул miR [35, 36]. Оказалось, что эффект умолкания гена при действии редактированной miR резко снижается [37]. Следовательно, ADAR может выступать в качестве антагониста действия RNAi, что подтверждают и данные работы с нематодой, нокаутированной по гену ADAR [30].

Итак, в результате изучения miРНК выявлена их важная роль для таких биологических процессов, как развитие, пролиферация, дифференциация, канцерогенез, выживание клетки и апоптоз. Естественно, возник вопрос о роли молекул этого класса в проявлении клеткой чувствительности или устойчивости к действию того или иного стресса, а также цитотоксического лекарства как фактора клеточного стресса.

В многочисленных работах [38—52] показано, что при ряде патологий в клетке выявляются изменения в количественном содержании и составе изучаемых miРНК. Это охватывает такие заболевания, как различные вирусные инфекции, болезни сердца, нейродегенеративные заболевания, диабет, злокачественные опухоли и рак крови. Основной прием демонстрации причастности биологии miR к развитию той или иной патологии состоит в сравнении профилей молекулярного поведения изучаемого материала или данных наличия тех или иных miR в тех или иных количествах в клетках с изучаемой патологией и в нормальных клетках. Обнаружение различий в этих профилях и открывает путь к установлению причин патологии и развитию фармакологических средств ее устранения. В основе этого приема лежит использование носителей, на которые нанесены библиотеки нуклеотидных последовательностей, представляющие молекулы miR в виде многочисленных рядов, организованных по номерам индивидуальных miR. Такие носители получили название микроэреев (*microarray*). Из больных и здоровых клеток выделяют фракцию низкомолекулярной некодирующей РНК и подвергают ее реакции RT—PCR-амплификации. В этой реакции с помощью RT — обратной транскриптазы на РНКовых молекулах синтезируется праймер в качестве затравки для работы ДНК-полимеразы, которая создает ДНКовую нить по матрице miR. Этот процесс многократно повторяется, амплифицируется (PCR — *polymerase chain reaction*). Полученный таким накопительным образом ДНК-продукт исследуемой miR гибридизуется с исходным miРНК-носителем, что по получаемому профилю гибридизации этих молекул позволяет определить количественное содержание той или иной индивидуальной miРНК, а также охарактеризовать спектр функционирующих в том или ином случае miR.

Началось интенсивное изучение профилей miРНК клеток, функционирующих при разных условиях. Это позволило получить такой важный результат, как обнаружение профиля клеточных miR, при котором наблюдается метастазирование раковых клеток, которое принципиально может быть подавлено введением в клетки недостающих miR [38—40]. Изучение данного профиля также может быть использовано в качестве прогностического маркера для конкретного больного. Более того, оказалось, что продолжительность жизни у микроскопического червя нематода четко связан с составом функционирующих miR, с их качеством и количеством. Удивительно, но гены — мишени действия miR, от которых зависит продолжительность жизни червя, прак-

тически идентичны генам, содержащимся в геноме человека [41]. Поистине в биологии открываются самые широкие горизонты изучения возможностей управления жизнью.

Развитие техники микроэрея и получения представительных библиотек miR позволили перейти также к изучению вопроса о значении различий в профилях содержания различных miРНК в клетках, чувствительных и устойчивых к действию того или иного химиотерапевтического средства. Кратко охарактеризуем данные, полученные при изучении этого вопроса.

Прежде всего, получены данные, показывающие, что в изучаемых профилях miРНК, выделенных из чувствительных и устойчивых к действию доксорубина клеток раковой опухоли груди, выявляются резко бросающиеся в глаза различия [42]. Авторы отметили, что им впервые удалось наблюдать снижение уровня экспрессии генов, кодирующих Dicer и Ago2-белок RISC-комплекса. Вскоре китайские исследователи опубликовали выявленные различия в профилях miR также клеток рака груди [43]. При сравнении профиля гибридизации miR [42] из устойчивых и чувствительных к действию доксорубина клеток выявлено резкое снижение количеств miR-451 в устойчивых клетках, которая оказалась сдерживающим началом работы ABC-транспортного белка — MDR1, функционирующего в качестве насоса, откачивающего из клетки поступившее в него лекарство. Введение же в такие устойчивые клетки с помощью трансфекции недостающих количеств miR-451 повышало чувствительность их к доксорубину, останавливавшему рост опухоли. Следовательно, в решении проблемы хемотерапевтической устойчивости открывается новая перспектива направленности поиска решений, связанных с разработкой возможности коррекции в обеспечении клетки соответствующим miR. Изучая экспрессию генов из чувствительных и устойчивых линий культуры MCF-7 клеток китайские авторы обнаружили изменения в количественном содержании 36 генов: для 16 из них отмечено перепроизводство, для 20 — недопроизводство. При этом наблюдались изменения в устойчивых клетках по сравнению с чувствительными в содержании 14 miR: количество 7 из них увеличивалось (среди них miR-221, 222, 130a, 155), других 7 (среди них miR-200a, 200b, 200c и miR421) — уменьшалось. Какие гены претерпевали функциональные изменения и каким было поведение клеток относительно действия доксорубина, в этой работе не сообщается.

Особый интерес в изучении активности miR в развитии рака груди и его лечении представляет работа [44]. В этой работе, опубли-

ликованной спустя лишь месяц после сообщения китайских авторов, изучали профиль miR в клетках MCF-7, отвечающих (контроль) и не отвечающих на цитостатическое действие тамоксифена как аналога, способного предотвратить стимулирующий эффект эстрогена на рост опухоли. Оказалось, что в случае тех клеток, для которых тамоксифен неэффективен в предотвращении роста опухоли, наблюдалось (как и в работе [43]) резкое увеличение содержания miR-221 и miR-222. Прорыв в изучении функциональной значимости этих miR заключался в демонстрации гена-мишени их действия. Такой мишенью оказался ген, кодирующий p27^{Kip1}-белок, который функционирует как ингибитор циклинзависимых киназ (см. главу 7, рис. 7.13). Таким образом, снижение в клетке концентрации ингибитора клеточного цикла за счет активности указанных miR способствовало безудержности деления клеток и подавляло апоптоз, индуцируемый тамоксифеном. Следовательно, перепроизводство miR-221 и miR-222 в организме пациентов с онкозаболеванием молочной железы снижает эффект действия тамоксифена и способствует росту опухоли.

Интересные наблюдения о связи между уровнем экспрессии некоторых miR и поведением злокачественной клетки относительно фармакологического воздействия сделаны в работе [45]. Для экспериментов были выбраны три miR: let-7i, miR-16 и miR-21. Уровень их экспрессии в клетке либо повышали за счет трансфекции данных экзогенных молекул, либо снижали, вводя в клетки антисмысловые олигомеры. На клетках с установленным фенотипом относительно miR изучали действие 14 антираковых препаратов различных химических классов. Это позволило определить, что существует корреляция между содержанием в клетке miR и чувствительностью ее к химиотерапии. Из этого исследования также следует, что увеличение эффективности химиотерапии связано с разработкой возможности контроля над активностью тех или иных miR в клетке.

Важность для жизнеспособности клетки установленного miR-механизма регуляции клеточных процессов стала основой наблюдаемого в настоящее время смещения центра тяжести исследований в молекулярной биологии с молекул белков (*protein-centric biology*) на молекулы РНК (*RNA-centric biology*). Это подтверждают результаты работы [46], в которой обнаружено, что возникновение лекарственной устойчивости раковой клетки, в частности к доксорубину и вызываемому им апоптозу, связано с сверхпродукцией определенного гена, названного «*CUDR*» (*cancer up-*

regulated drug resistant). Продуктом этого гена, не имеющего гомологии нуклеотидной последовательности ни с одним из известных генов, оказалась также некодирующая РНК, однако размер ее составил примерно 2,2 т. н. Ни одним из существующих методов не была обнаружена причастность этой РНК к процессу трансляции. Но сверхпродукция этой РНК в клетке приводит к подавлению синтеза необходимой для апоптоза каспазы 3. Такой же эффект наблюдался при трансфекции клеток с помощью этого гена. Таким образом, механизм регуляции генов с помощью молекул РНК, очевидно, многолик.

Итак, раскрытие механизма функционирования таких молекул, как miR обосновало новое направление в биологических исследованиях, связывающее протекание того или иного заболевания со статусом генов, кодирующих miR. Так, в работе [47] установлено, что при изучении профиля экспрессии miR при раке яичника также выявлялись различия по сравнению с нормой таких miR, как miR-214, miR-199a*, miR-200a, miR-100, miR-125b и всего кластера (скопления) let-7 miR молекул. Детальное изучение роли молекул miR-214 в жизнедеятельности таких клеток показало, что эти молекулы связываются с 3'-нетранслируемой областью (UTR) мРНК гена PTEN (кодирует фосфатазу, дефосфорилирующую такой компонент мембраны, как фосфотидилинозитол), что приводит к подавлению АКТ сигнального пути выживания клетки за счет уменьшения вероятности апоптоза. Использование же ингибитора Аккиназы, а также введение в клетки кДНК, кодирующей мРНК гена PTEN, не содержащую 3'-UTR, нейтрализует действие miR-214, усиливая апоптоз клетки и ослабляя ее устойчивость к цисплатину.

Профиль miРНК был изучен и в случае клеток рака простаты как зависящего, так и не зависящего от уровня андрогена в организме. Согласно полученным результатам существуют различия в содержании пяти различных miR. Большое внимание привлекла особенно одна из них, так как наблюдалось самое большое перепроизводство ее в клетках опухоли простаты как зависящей, так и не зависящей от уровня андрогена в организме. Это miR125b [48]. Таким образом, успех в химиотерапевтическом лечении рака простаты связан с возможностью контроля над уровнем содержания в клетке miR125b и выяснения, как необходимость снижения этого уровня может отразиться на жизнеспособности здоровых клеток организма.

В ряде работ [49, 50] изучена роль miR в подавлении активности важнейших ABC-переносчиков — множественных экспор-

теров лекарств из клеток (*MDR exporters*), а также антиапоптотического белка Bcl2. С помощью miR оказалось возможным снизить активность MDR-белка и ослабить устойчивость клеток к антираковым лекарствам. Также подавление синтеза белка Bcl-2 значительно увеличивает число клеток, входящих в апоптоз [49]. Более того, изучение 3'-UTR мРНК одного из MDR-экспортеров как в исходных родительских, так и возникших устойчивых дочерних клетках показало, что эта область данной матрицы в родительских клетках на 1500 нуклеотидов длиннее и на этом участке возможна посадка соответствующей предполагаемой молекулы miR. Высказано предположение, что отсутствие этого участка в мРНК MDR-экспортера приводит к нарушению регуляции экспрессии данного гена так, что его продукта в клетке становится много, лекарство интенсивно выводится из клетки, обуславливая устойчивость клетки к химиотерапии [50]. Ясно, что характер такого усложнения во взаимодействиях этих молекул еще требует дальнейшего изучения.

Техника использования miR, приводящих к умолчанию тех или иных генов, позволяет идентифицировать за счет выключения функции (*knockdown*) того или иного гена, влияющего на проявление клеткой устойчивости к тому или иному лекарству. Такая работа была проведена в [51], где с помощью коллекции коротких шпилечных РНК можно было выключать 132 различных гена. Это позволило обнаружить, с активностью каких генов связано поведение клетки по отношению к такому антираковому лекарству, как паклитаксель. Выключение функции, или нокаун таких генов, как *MDR1*, гена белка сэвайвина повышают токсичность паклитакселя, внимание же привлек результат повышения устойчивости клетки к этому лекарству из-за излишней экспрессии гена, продукт которого оказался фактором, необходимым для процессинга pre-mRNA и созревания молекул мРНК. Ген этого продукта получил название PRP-4. Действительно, его амплификация обуславливала умеренные подъемы устойчивости клеток к паклитакселю, доксорубину и винкристину. Итак, исследования в области малых интерферирующих РНК расширяют возможность изучения устройства клетки, способов функционирования и контроля над работой таких средств клетки, с помощью которых она защищается от эффектов внешнего воздействия, включая действие химических веществ.

Исследования в области miR привлекли внимание к таким молекулам, как miR-199a и miR-199a* (miR199a/a*) [52]. Особенность

их состоит в том, что они созревают на основе одного и того же предшественника, хотя в конечном виде имеют различия. Эти молекулы интересны тем, что экспрессия их генов происходит только в клетках фибробластов. При установлении причин такой избирательности было показано, что если во всех других тканях определенные локусы на хромосомах 1 и 19 метилированы, то в фибробластах для этих локусов характерно неметилированное состояние. Если же в клетки опухолей самых разных тканей вводить экзогенные молекулы этих miR, то наблюдается вхождение клеток в апоптоз, связанный с активацией каспаз. С помощью техники микроэррея обнаружено, что мишенью действия описываемых miRs, является протоонкоген MET, который они подавляют. Более того, оказалось, что от активности этого протоонкогена зависит активность сигнального пути киназы ERK2 (*extracellular-regulated kinase*), проводящей сигналы, которые поступают в клетку извне. Очевидно, самые разные ткани используют защитное метилирование соответствующих нуклеотидных последовательностей от активности ERK2 сигнального пути и, возможно, лишь в фибробластах имеется какое-то другое компенсаторное средство. Итак, результаты, полученные и в этой работе, указывают на целесообразность разработки возможности использования молекул miR-199a/a* для снижения интенсивности пролиферации клеток опухоли, особенно тех, которые приобрели устойчивость по отношению к применяемым антираковым лекарствам.

Влияет ли такая химическая модификация, как метилирование нуклеотидных последовательностей на функционирование самих miR? Как пример исследований этого рода приведем работу [53]. Ранее было отмечено, что метастазирование клеток опухоли связано с возникновением специфического профиля miR-молекул в клетке. Сразу же возник вопрос о связи между уровнем метилирования генов молекул miR и их способностью определять у молкание генов. Для выяснения этого вопроса в лимфатические узлы онкологических больных вводили фармакологические средства, способные деметилировать ДНК, и изучали, какие miR появлялись в клетках после их демитилирующей обработки. Ими оказались miR-148a, miR-34b/c и miR-9, которые в раковой клетке в отличие от нормальной находятся в гиперметилированном состоянии. Действительно, введение в клетки активных экзогенных молекул miR-148a и miR-34b/c уменьшало рост опухоли и метастазирование. Таким образом, если miR делятся на те, которые способны принять на себя функцию онкогена, и те, которые функционируют как он-

косупрессоры, то умолкание последних утяжеляет течение заболевания и ухудшает его прогноз. Ясно, что предотвращение умолкания за счет гиперметилирования генов miR как онкосупрессоров — еще одна точка приложения для поиска эффективных мер борьбы с раком.

Подводя итоги изложенному в этой главе материалу, следует отметить, что обнаружение таких факторов регуляции генной активности, как микроРНК позволило показать, что существует четкая корреляция между количественным и качественным содержанием miR в клетках, чувствительных и устойчивых к действию того или иного цитотоксического лекарства. Механизмы действия этих регуляторов разнообразны и могут быть связаны и с повышением, и со снижением их концентрации в клетке. Например, если увеличивается концентрация miR, запрещающей синтез ингибитора фермента, удваивающего геном клетки перед ее делением, то рост клеток становится злокачественным. Если концентрация соответствующей miR уменьшается, то это останавливает работу насоса по выбросу лекарства из клетки, и эффект действия лекарства увеличивается. При всем многообразии механизмов хемоустойчивости и практически невозможности установления в клинике причин химиотерапевтической устойчивости клетки в каждом случае задачу по выбору лекарств облегчает возможное клиническое изучение профиля miR конкретного больного. Обнаружение тех или иных miR позволяет сразу установить, лекарства против каких мишеней окажутся бессмысленными, а это ускоряет и облегчает выбор правильных средств борьбы с патологиями. Описанию этого подхода посвящен обзор [54]. Ясно, что установление роли микроРНК в определении фенотипа чувствительности или устойчивости клетки к той или иной химиотерапии поднимает вопрос о механизмах регуляции активности генов этих молекул *in vivo* и возможности управления такими механизмами. Оказалось, что один из этих механизмов связан с возможностью лишь так называемых эпигенетических, или не затрагивающих генетический код, изменений. Они представляют собой химические модификации в виде появления метильных групп в определенных нуклеотидных последовательностях.

Характеристике эпигенетических изменений, их роли в биологии клетки и проявлению ею хемоустойчивости посвящена следующая глава книги.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИНФОРМАЦИОННЫХ МОЛЕКУЛ И ХЕМОУСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТКИ

Определим кратко понятие эпигенетики и поставим цель раскрыть ее место и значение в осуществлении базовых элементарных процессов жизнедеятельности и проявлении клеткой такого фенотипа, как хемоустойчивость.

Генетика как наука сформировалась на пути поиска ответа на вопрос о механизме наследования видовых признаков организма в поколениях. Становление понятия гена в начале XX ст. и установление структуры ДНК в 1953 г. как носителя генетической информации стали центром тяжести мышления в генетике. Однако уже в эмбриональном состоянии развития этой науки один из видных ее теоретиков Ч. Уоддингтон (Ch. Waddington) обосновал еще в 1939 г. причинные взаимодействия между генами и их продуктами, что определяет фенотип («*the causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being*» [цит. по: [1])). Из этого следовало, что если фенотип зависит от такого взаимодействия, то оно может быть разным в зависимости от сложившихся условий функционирования конкретной биологической системы. Это представление, первоначально развиваемое скорее интуитивно, нежели на основе воспроизводимых экспериментальных данных, обернулось порожденной Лысенкоизмом трагедией для развития генетики в социалистическом лагере мира XX ст. Административное игнорирование исследований на фундаментальном уровне и устранение из науки его носителей в конечном счете привели Лысенкоизм к краху, что способствовало забвению в социалистическом лагере на долгое время идеи эпигенетики. Однако весь ход фундаментальных исследований в мире показал значимость эпигенетики для процессов жизнедеятельности и для различных нарушений, обуславливающих те или иные заболевания.

Что означает слово «эпигенетика»? Греческая приставка «эпи» придает слову значение дополнительности действия к тому, что обуславливает сама генетика. Если базовый закон генетики осно-

ван на декодировании генетической информации согласно генетическому коду, т.е. характеру нуклеотидной последовательности информационной молекулы, то сфера эпигенетики — это изменение характера активности гена, не связанное с изменениями в нуклеотидной последовательности ДНК [2]. Какие же факторы независимо от генетического кода влияют на активность гена?

9.1. О ПРОСТРАНСТВЕННЫХ ФАКТОРАХ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ

Одним из первых хорошо изученных примеров, раскрывающих эпигенетическую природу процесса, стало первоначально изученное в мире прокариот исследование судьбы в клетке-хозяине вируса кишечной палочки — бактериофага лямбда. При неизменности нуклеотидных последовательностей генома этого вируса возможны две реакции инфицированного хозяина — литическая и лизогенная. В первом случае все вирусные гены активны, вирус размножается и разрушает клетку. Во втором случае вирусная ДНК интегрируется в определенное место ДНК хозяина, активность вирусных генов подавляется с помощью соответствующего репрессивного аппарата, вирусная ДНК реплицируется под контролем клеточных механизмов репликации, состояние лизогенности передается потомкам. При разрушении же вирусного репрессора под действием, например, ультрафиолетового облучения вирусная ДНК приобретает автономию, производство вирусного материала со всеми вытекающими последствиями становится возможным [3]. Таким образом, в данном случае важна не только сама генетическая информация, но и способ управления нею, который зависит от конкретных условий, сложившихся в клетке. Изучение этих условий позволило определить, от каких факторов клетки-хозяина, условий их появления в клетке и сферы их действий зависит то или иное поведение вируса в клетке.

Установление эпигенетического влияния на реализацию генетической информации в зависимости от ее локализации в клетке не только открыло путь для изучения самых разнообразных интеграционных процессов на уровне ДНК. В связи с этим в мире эукариот сразу же возник вопрос о характере расположения хромосом в интерфазном ядре, архитектуре ядра в целом и возможности функционально значимых изменений в локализа-

ции хромосом при различных патологиях и различных воздействиях на клетку.

Развитие методов прижизненной визуализации компонентов клетки (*live cell imaging*) [4], среди которых особое место принадлежит методу флуоресцентных меток, позволило подойти к изучению поставленной проблемы. Наиболее распространенным методом исследований интерфазного ядра является метод FISH — *fluorescent in situ hybridization*. При этом в качестве зонда используют соответствующую нуклеотидную последовательность, при синтезе которой *in vitro* происходит включение нуклеотида, содержащего флуоресцентную метку. Полученный флуоресцентный зонд наносится на препарат клеток, ядро которых находится в интерфазном состоянии. Обнаружение при флуоресцентной микроскопии свечения и указывает на локализацию изучаемых генов в ядре. Оказалось, что даже в интерфазном ядре хромосомы упакованы не как попало (*non-random localization*), а занимают строго определенные места, получившие название хромосомных территорий [5]. Таким образом, ядру присуща своя архитектура, которая, очевидно, и определяет характер связи между структурой и функцией этой единицы биологической организации. Как же пространственная организация генома и его организация во времени определяют активность генов? Сформировалась новая парадигма исследований генома, отличающаяся от изучения характера нуклеотидных последовательностей, составившего в генетике геномную эру. Проблеме хромосомного позиционирования посвящен ряд обзоров [6—11]. Здесь рассмотрим следующее.

Исследование характера расположения материала хромосом в интерфазном ядре позволило выявить три типа нехаотичной укладки хромосом в ядре, или монтажа генома (рис. 9.1, см. вклейку).

Это так называемая конфигурация Рабла с прямо противоположной ориентацией в ядре центромерных и теломерных участков хромосом. Второй тип организации хромосом в ядре составляет радиальное расположение материала отдельных хромосом по экватору ядра. И третий тип — это фиксированное расположение этого материала по всему объему ядра, исключаяющее какие-либо изменения в расположении относительно друг друга. Изучение моделей такого расположения хромосом находится еще в начальной фазе развития и, несомненно, будущее углубит первоначально полученные знания.

Как же материал хромосом находит место своего расположения в ядре и как придерживается его во времени? В настоящее время

полученные результаты показывают, что хромосомные территории не перекрываются, функционируют не только своей поверхностью, но и в глубине, напоминая проницаемую для белков губку, сплошь пронизанную каналами. Очевидно, в узнавании определенных компонентов соответствующей территории важную роль играет хроматин. Он также определяет привязывание генетического материала к ядерной оболочке, основной компонент которой — белок ламин, а также к белкам, образующим ядерные поры. (Ламин обнаружен также и во внутренних структурах ядра, возможно, — в ядерном матриксе.) Материал, привязанный к ядерной оболочке, теряет свою подвижность, что облегчает достижение порядка в клетке. Более того, очевидно, еще какие-то структуры ядерного матрикса фиксируют положение хромосом в интерфазном ядре, что ограничивает их подвижность. Важность позиционирования хромосом и ограничение их подвижности, влияющей на это позиционирование, иллюстрирует пример, связанный с функционированием ядрышка. Определенный ряд хромосом, содержащих повторяющиеся гены рРНК, называемые ядрышковым организатором, должны находиться в ядерном пространстве в объединенном состоянии так, чтобы вокруг высокоэкспрессируемых рибосомальных генов концентрировались необходимые транскрипционные факторы и формировалась специальная структура в виде ядрышка. Оно удерживает хромосомы с этими генами от флуктуаций по ядерному пространству, и это обеспечивает эффективность считывания данных генов. Возможно, такой принцип реализуется в случаях самых различных генов, хотя и менее выражено.

Если генетический материал монтирован в ядре неслучайным образом, то каковы последствия для клетки изменений в характере расположения хромосом в ядре?

Использование различных зондов и возможность однозначности в демонстрации расположения носителей той или иной генетической информации либо на периферии ядра, либо в его центральных внутренних областях, позволило выявить закономерность расположения хромосом. На периферии ядра чаще всего располагаются те хромосомы, которые содержат меньшее число генов, в то время как хромосомы, обогащенные генами, сосредоточены в середине ядра [12]. Имеются также данные [11], что в расположении хромосом важен такой показатель, как их размер: мелкие располагаются в центре, крупные на периферии. Однако в настоящее время считается, что это очень упрощенное правило и истинные закономерности еще предстоит установить. Более того,

оказалось, что эухроматиновые участки хромосом с большим числом генов локализируются в непосредственной близости к порам ядра, гетерохроматиновые же протяженности занимают участки, расположенные между порами ядра [13]. Известно, что принадлежность гена гетерохроматину — это фактор выключения его активности. Следовательно, перемещение гена из одной области ядра в другую чревато изменением программы его активности. Действительно, в нормальных мужских кортикальных нейронах X-хромосома локализована на периферии ядра, в то время как в биологическом материале больных эпилепсией для нее характерно расположение в его центральных районах. Особо ярким примером значения позиционирования хромосом в ядре является поведение соматического ядра в безъядерном ооците, полностью перекраивающего расположение хромосом соматического ядра, чем настраивает это ядро на осуществление программ, выполняемых ооцитом [14].

Важной проблемой рассматриваемой области является проблема изучения механизмов пространственной организации генома. Еще только начаты необходимые исследования, которые позволяют поставить вопрос о принципах, используемых при локализации хромосом в ядре. Что же при этом является основополагающим: некие структурные элементы архитектуры самого ядра (например, такие, как ламин оболочки, а также центромеры и теломеры самих хромосом) или пространственная укладка генома — это продукт самоорганизации, направляемой функциональной активностью генома. Итак, вопрос поставлен следующим образом: определяет ли структура функцию или функция определяет структуру. Такого генерального направления исследований в этой области в настоящее время.

Неслучайность локализации хромосом в ядре и ограничивающее действие хромосомных территорий призваны, очевидно, решать ответственную задачу, связанную с соблюдением определенной дистанции между хромосомами. Эта дистанция может определять вероятность такого явления, как транслокация хромосом, или вероятность обмена какими-то участками между различными хромосомами. Нарушение при патологиях рисунка позиционирования хромосом, присущего норме, обуславливает незаконное сближение (*proximity*) разных хромосом. Существующая вероятность двойных разрывов ДНК, особенно в хромосомах с большим содержанием ДНК, и появление в этой молекуле концов и приводит к транслокациям, особенно часто выявляемых при раке.

9.2. О ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК И ГИСТОНОВ КАК ФАКТОРЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ

Помимо эпигенетических факторов, организующих геном в пространстве, большое значение для проявления активности генов имеет фактор установленной химической модификации оснований ДНК. Такая модификация зависит от тех или иных условий функционирования клетки, различных этапов развития организма, а также выбора в диплоидном организме только одной функционирующей аллели из двух аллелей гена, полученных от родителей. Это явление называется импринтингом аллелей. Химическая модификация оснований ДНК — это возможность их метилирования. Отметим, что в мире эукариот метилированию подвергается только цитозин по 5-му положению углерода в бензольном кольце — 5mC, в то время как в мире прокариот метилированию подвергается в основном аденин и иногда цитозин. Измерено содержание модифицированных оснований в ДНК различных видов экосистемы. Наибольшее его содержание характерно для растений — ~9 %, у млекопитающих ~3 %, в ДНК дрозофилы и других насекомых 5 mC не обнаружен вообще. Оказалось, что в геномах млекопитающих распределение цитозина в генетическом тексте характеризуется определенной закономерностью, связанной либо с частой, либо с редкой встречаемостью этого основания в динуклеотидах CpG. Обычно метилируется разбросанный по геному цитозин, который обязательно предшествует гуанину. Места же повышенной встречаемости этого основания в составе динуклеотидов CpG названы островками CpG. Промоторы примерно 60 % генов содержат такие островки. Как правило, цитозин в них не метилируется, хотя это правило нарушается при патологиях.

Обнаружение модифицированных оснований в молекулах ДНК поставило вопросы о том, как происходит в клетке такая химическая модификация и каково ее функциональное значение.

Прежде всего, установлено, что донором метильных групп в клетке является такое соединение, как S-аденозил-метионин (SAM) продукт взаимодействия между АТФ и метионином. Это соединение служит субстратом для ферментов, получивших название ДНК-метилтрансфераз (DNMT). В генах этих ферментов выявляются специфические нуклеотидные последовательности, или мотивы (порядка 10 разновидностей таких мотивов). Наибо-

лее изучены три DNMT — DNMT1, DNMT 3a и DNMT3b, в то время как DNMT2, или TRDNMT2, метилирует не ДНК, а цитозин-38 в антикодонной петле аспарагиновой тРНК.

Изучение ферментов, метилирующих ДНК, показало, что они предназначены для выполнения задач двух типов: 1) метилирования, поддерживающего сформировавшийся рисунок расположения метильных групп в геноме; 2) введения в геном метильных групп в какие-то новые места, или метилирование *de novo*. Поддерживающее метилирование связано с появлением в клетке гемиди(полу)-метилированной ДНК, одна из старых нитей которой содержит 5mC, в то время как нить, вновь синтезированная при репликации ДНК, лишена его. Если бы не было поддерживающего метилирования, то прохождение клетки через клеточные циклы полностью устраняло 5mC и нивелировало бы роль химической модификации генома, необходимой для процессов жизнедеятельности. Показано, что за поддерживающее метилирование отвечает DNMT1, и действительно оказалось, что у мышей нокаут гена этого фермента приводит к летальному исходу.

Какова же функциональная роль введения метильной группы в ту или иную молекулу цитозина в данном геноме? Отвечая на этот вопрос кратко, следует отметить, что при декодировании имеющейся генетической информации соответствующая аппаратура клетки может «читать» текст, содержащий цитозин, но не может делать этого, если цитозин метилирован. Следовательно, метилирование цитозина ведет к умолчанию гена и, таким образом, с помощью этой химической модификации может осуществляться регуляция активности того или иного гена. Ярким примером, демонстрирующим существование такого уровня регуляции генной активности, служит раковая клетка. В этом случае, для которого характерно разрегулирование активности многих генов так, что в клетке наблюдается переизбыток их продуктов, наблюдается тотальное гипометилирование в геноме. Что касается активности генов, кодирующих онкосупрессоры, промоторы которых, как правило, содержат островки CpG, то здесь, напротив, имеет место гиперметилирование, выключающее активность этих важных для развития канцерогенеза генов.

Почему метилирование оснований ДНК в клетке играет важную роль в определении активности генов? Оказывается, оно отражается на характере упаковки ДНК в ядре. Действительно, ДНК в виде нуклеосом намотана, как на шпульке, на белковой структуре, образующей центральную часть нуклеосомы, — кор. Эта струк-

тура представлена комплексом таких белков, как гистоны H2A, H2B, H3 и H4, в то время как гистон H1 используется для соединения двух соседствующих нуклеосом молекулы ДНК. Для того чтобы ген мог проявить свою активность, важен характер нуклеосомной упаковки в данном месте генома в данное время его функционирования. Оказалось, что этот характер определяется рисунком расположения химических модификаций не только в ДНК, но и в молекулах гистонов.

В случае гистонов химические модификации составляющих их аминокислот представлены не только метилированием, но также ацетилированием, фосфорилированием, АДФ-рибозилированием и убиквитированием. Были обнаружены ферменты, осуществляющие соответствующие реакции как в прямую, так и в обратную сторону. Какое новое качество гистонам придает химическая модификация составляющих их аминокислот? Рассмотрим пример ацетилирования неструктурированной части молекулы гистона H3, называемой хвостом. Расположенные в хвосте остатки лизина несут положительный заряд и благодаря этому они прочно связываются с ДНК, беря ее как бы в «шоры». Ацетилирование же хвостовых лизинов снижает положительный заряд и за счет этого связь H3 с ДНК ослабляется. При таком условии облегчается взаимодействие ДНК с транскрипционным фактором SWI/SNF, который еще больше расслабляет ДНК так, что транскрипция гена становится возможной. Однако не всегда значение той или иной химической модификации может быть объяснено с позиций электростатического взаимодействия.

Обнаружение различных химических модификаций в молекулах гистонов открыло путь к изучению ферментов, осуществляющих необходимые реакции. Так были открыты гистоновые ацетилтрансферазы (НАТ) и фермент, устраняющий эту модификацию — HDAC — гистоновая деацетилаза. Отметим, что этот фермент особенно привлек внимание в качестве мишени для поиска антираковых лекарств. Действительно, эффективный ингибитор этого фермента должен инактивировать HDAC так, что деацетилирования не происходит и, следовательно, ДНК может находиться в расслабленном состоянии, и это должно способствовать активации молчащих при раке генов онкосупрессоров. Поиск таких ингибиторов и их клиническое изучение продолжаются.

Большое внимание в настоящее время уделяют также изучению ферментов, метилирующих молекулы гистонов в различных положениях, их взаимодействию с другими белками клетки и ап-

паратом клетки, ответственным за метилирование цитозина. Результаты этого изучения подробно описаны в главе 3 книги [15]. Здесь отметим следующее.

В результате изучения характера модификаций молекул гистонов выявлено, что для каждой условий функционирования клеток существует специальный рисунок внесения модификаций в молекулы гистонов, который определяет для этих условий активность тех или иных генов в клетке. Так возникло понятие о гистоновом коде как о множественных динамических модификациях, способных регулировать активность генов.

Более того, введение различных модификаций в молекулы гистонов может служить опознавательным знаком для белков, важных для придания хроматину более открытой или, напротив, закрытой для функции формы. Это называется ремоделированием хроматина (*chromatin remodeling*). Белки, узнающие ацетильные группы, обладают соответствующим доменом, который получил название бромодомена. Бромодомен — это домен, который узнает в молекуле гистона метильные группы в различных положениях молекулы. Белки, обладающие SET-доменом, способны метилировать различные аминокислотные остатки гистонов, за исключением лизинов.

Между процессами метилирования ДНК и гистонов существует тесная связь: при нарушении аппарата метилирования ДНК нарушаются процессы метилирования гистонов и наоборот. Более того, установлено, что эпигенетическое изменение того или иного локуса генома определяются его комплементарными взаимодействиями с РНК интерференционного пути, а также ДНК—ДНК-взаимодействиями. Такой тип взаимодействий привлекает к этому локусу соответствующий клеточный аппарат метилирования, модифицирующего как основания ДНК, так и молекулы гистонов. Возникло специальное понятие — РНК-направляемое метилирование (*RNA-directed methylation — RdM*), вызывающее эффект транскрипционного сайленсинга. Таким образом, использование такого инструментария клетки, как микроРНК расширяет возможности приспособительных реакций клетки и оптимизирует ее функционирование в различных условиях бытия.

Что касается ДНК—ДНК-взаимодействий, то для участков генома выявляется полиморфизм последовательностей, определяемый повторами — RIP (*repeat-induced polymorphism*), и полиморфизм, обусловленный процессами мейоза, — MIP (*meiosis-induced polymorphism*). При изучении tandemных и дисперсно повторяю-

щихся последовательностей в геномах эукариот в них обнаружен значительный полиморфизм, связанный с заменами пар G/C на A/T. Оставшийся же цитозин заменяется на 5mC. Смысл таких модификаций может заключаться в том, чтобы ослабить эффективность спаривания гомологичных участков генома. Это снизит вероятность осуществления в клетке эктопической рекомбинации, что отразится на проявлении геномом свойства пластичности и его способности к перестроечным процессам. Очевидно, в тех участках генома, в которых возможность гомологичного взаимодействия повышена, должно происходить активное привлечение аппарата метилирования и интенсивное метилирование таких областей, как, например, промоторы генов. Из этого можно заключить, что через повторы и их метилирование может осуществляться еще один уровень регуляции генов.

Через повторы последовательностей могут регулироваться и негомологичные участки генома так, что в геноме возникает сеть взаимодействий, в которой изменения в одной области могут передаваться по геному, либо затухая, либо усиливаясь. Существование такого взаимодействия доказывает установленное явление трансекции, или управления, при спаривании гомологичных хромосом активностью *in trans* гена одной хромосомы с помощью регуляторных последовательностей, находящихся в другой гомологичной хромосоме. Изучение этого явления только начинается. Однако на роль такой регуляторной последовательности выдвигается в настоящее время последовательность CNG, которая в геномах различных млекопитающих не проявляет какие-либо закономерности в отношении геноспецифического расположения. С позиций существования таких последовательностей можно объяснить синдром Дауна и наблюдаемые эффекты анеуплоидий, которые могут быть обусловлены нарушениями в копийности CNG, управляющих не одним, а сразу многими генами. Таким образом, наличие специального класса регуляторных последовательностей, отвечающих не просто за регуляцию отдельных генов, но воспринимающих координаты пространственного расположения того или иного генома, определяет его доменную организацию, связывающую отдельные домены в единое целое, в котором состояние одного домена влияет на состояние другого. В результате такого влияния и появляется тот или иной фенотип, оптимальный для данных условий функционирования.

Если метилирование ДНК и ремоделирование хроматина — еще один уровень регуляции генной активности, от которой зави-

сит фенотип организма, то возникает вопрос о возможности передачи в поколениях эпигенетической информации или рисунка расположения химической модификации оснований геномной ДНК. Вопрос о том, передаются ли приобретенные в результате эпигенетических изменений признаки по наследству — это острый вопрос, стимулировавший исследования в течение длительного времени. В настоящее время на этот вопрос можно ответить и положительно, и отрицательно [16]. Кратко остановимся на фактах, доказывающих возможность передачи эпигенетических признаков в поколениях.

9.3. О ПЕРЕДАЧЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ В ПОКОЛЕНИЯХ

Первоначально при изучении связи между наблюдаемым фенотипом и состоянием метилирования соответствующих генов, определяющих этот фенотип, в случае такого объекта, как растения, возникло понятие о парамутации. Если мутация — это передающееся в поколениях изменение буквы генетического текста, то парамутация оставляет ту или иную нуклеотидную последовательность без изменения, отвечая лишь за состояние метилирования цитозина в том или ином положении этой последовательности. Так, было показано, что белая окраска цветка у петунии связана с сайленсингом одного из генов, необходимого для синтеза соответствующего пигмента. Сайленсинг этого гена обусловлен теми событиями в клетке, которые привели к возникновению химической модификации соответствующих оснований ДНК в пределах изучаемого гена. Передача белой окраски цветков последующим поколениям доказывает факт возможности наследования потомками эпигенетической информации. Однако какие-то изменения в условиях функционирования клетки делают эпигенетическое состояние гена обратимым, возвращая обусловленный этим состоянием фенотип к норме. Этот пример широко описан в многочисленной литературе, включая Интернет. Оказалось, что явление парамутаций возможно не только в мире растений, но широко распространено в экосистеме. Доказательством этого служит обнаружение данного явления даже у млекопитающих, например у мышей [17].

Наиболее детально механизм образования парамутаций изучается в настоящее время на примере аллелей гена в локусе *b1* хромосомы растений и гена *Kit* мышей, кодирующего рецептор тирозиновой киназы, от которой зависит также процесс мела-

ногенеза, а отсюда и окраска шерсти у мышей. Кратко охарактеризуем эти экспериментальные системы, изучаемые как у растений, так и у животных.

В случае растений локус *b1* генома содержит ген транскрипционного фактора, от активности которого зависит уровень экспрессии генов пути образования антоцианового пигмента. Он окрашивает стебли растения в яркий фиолетовый цвет при высокой (аллель *B-1*) или в слабо-сиреневый цвет при низкой экспрессии (аллель *B'*). Оказалось, что никаких различий в нуклеотидных последовательностях этих двух аллелей нет, следовательно, наблюдаемое изменение в окраске связано не с мутацией генетического текста. Однако различия в последовательностях этих аллелей все-таки выявляются, но не на уровне самих оснований, а на уровне метилирования цитозина этих последовательностей. При этом в кроссах высокоэкспрессируемой аллели *B-1* с низкоэкспрессируемой *B'* первая аллель может приобретать черты последней, становясь низкоэкспрессируемой аллелью *B-1**. Это свойство она сохраняет в поколениях, т. е. в скрещиваниях материала с парамутированной исходно высокоэкспрессируемой аллелью *B-1** с этой же высокоэкспрессируемой аллелью, но дикого типа последняя *B-1* аллель опять парамутирует, превращаясь в низкоэкспрессируемую аллель *B-1**. Однако это происходит только в тех скрещиваниях между организмами, материал которых полностью сохраняет активность РНК-зависимой РНК-полимеразы, и у мутантов *mor1*, дефектных по гену этого фермента, парамутации не возникают. Следовательно, к феномену возникновения эпигенетических мутаций — парамутаций — каким-то образом причастна РНК. Это открывает новую парадигму в изучении связи между генотипом и фенотипом. Если ранее считалось, что все молекулярные события в клетке происходят согласно коду, закодированному в ДНК, а молекулы РНК — это лишь послушный исполнитель ее воли, то новейшие результаты указывают на способность РНК каким-то, не раскрытым пока образом управлять генетическим кодом. И если мутация — это выключатель, чаще всего использующийся для выключения или включения активности гена, то пока загадочный какой-то РНКовый механизм — это реостат, с помощью которого можно задавать необходимый уровень экспрессии гена, оптимальный для данного времени и данных условий функционирующего организма. Возникает вопрос, как такой тип регуляции генной активности определяет формирование того или иного фенотипа.

На пути выяснения роли молекул РНК в эпигенезе было показано, что локусу b1 в геноме предшествует определенная последовательность, повторяющаяся 8 раз, и в этом месте генома возможна транскрипция с обеих нитей ДНК. Таким образом, в клетке имеется потенция для появления длинных двуспиральных РНК и активации пути функционирования интерференционной РНК. Действительно, только в клетках с активной РНК-зависимой РНК-полимеразой и содержащих соответственно высоко- и низкоэкспрессирующуюся аллели ответственного за пигментацию клеток гена В-1 и В* обнаруживаются короткие (25 н.) микроРНК, комплементарные указанной области повтора в геноме. Такой результат понятен в случае низкоэкспрессирующейся аллели и возможности ее влияния на высокоэкспрессирующуюся аллель через РНК, но почему при наличии данной микроРНК не выключается высокоэкспрессирующаяся аллель? Предполагается, что для успешной работы молекулярной машины, осуществляющей с помощью метилирования сайленсинг гена, только молекул микроРНК недостаточно, необходимы дополнительные условия. Одним из таких условий, возможно, является возникающая соответствующая структура хроматина и детали, связанные с архитектурной организацией ядра. Более того, важен также уровень содержания в клетке малых интерферирующих РНК и, очевидно, для его повышения и необходимо наличие в клетке РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Что касается парамутаций у животных, то было известно, что у мышей гомозиготы по неработающему гену Kit нежизнеспособны. Гетерозиготные мыши по этому гену, у которых количество мРНК уменьшено в 2 раза, живут, но их лапы и кончик хвоста утрачивают окраску, становясь белыми. Оказалось, что в скрещиваниях таких гетерозигот с гомозиготами по этому гену дикого типа или друг с другом резко нарушается менделевское расщепление и фенотип с белыми лапами и концом хвоста превалирует так, что сниженное количество мРНК поставляется даже аллелью дикого типа. Никаких изменений в тексте гена нет, изменения в метилировании промотора этого гена также не обнаружены. Что касается метилирования окружения этого гена, то данных еще нет. Однако ясно, что наблюдаемое явление относится к классу эпигенетических и классифицируется как парамутация. Оказалось, что к проявлению этого феномена также причастна РНК. На этот раз толчок исследованиям дало обнаружение следующего факта. Гаметы нормальных животных, не

проявляющих парамутационных эффектов, практически не содержали мРНК гена *Kit*, в гаметах же животных с белыми лапами и кончиками хвостов обнаруживаемые количества этой мРНК были значительными. И поступление через гаметы этой РНК каким-то образом снижало эндогенный уровень ее синтеза в клетках нормальных мышей. Инъекция молекул мРНК гена *Kit* в одноклеточные эмбрионы значительно увеличивала вероятность рождаемости особей с белыми лапами и кончиками хвостов. Такой же эффект давала инъекция молекул микроРНК, взаимодействующей с мРНК гена *Kit*. При проведении данных исследований удалось установить и такой факт. Если точечные мутации в мРНК *Kit* практически не отражались на получаемых результатах, то использование инженерных матриц, несущих различные вставки в молекуле мРНК *Kit*, значительно увеличивало выход парамутантных особей. Очевидно, Природа наделена особой чувствительностью к чему-то необычному, aberrантному и снабжена механизмами, нивелирующими какие-то возможные биологические эффекты всего aberrантного. Изучение этих механизмов становится горячей точкой современных исследований.

Итак, изложенный материал показывает важность общебиологического значения осуществляемой в природе химической модификации оснований ДНК. Возникает вопрос о связи между возможностью эпигенетических изменений и возникновением лекарственной устойчивости клетки в тех или иных условиях ее функционирования. Прежде чем суммировать имеющиеся в настоящее время данные по этой проблеме, для облегчения читателю поиска литературы и анализа методической информации рассмотрим методы современных эпигенетических исследований. Наиболее распространенные методы таких исследований описаны в обзоре [18], более полно они представлены в обзоре [19]. Кратко охарактеризуем эти методы.

9.4. О МЕТОДАХ ИЗУЧЕНИЯ СОСТОЯНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ОСНОВАНИЙ ДНК

Отметим, что прогресс в изучении состояния метилированности геномных последовательностей связан с успехом разработки нового инструментария, позволяющего осуществлять такие исследования. К такому инструментарии относится, в первую очередь, изучение продуктов обработки ДНК бисульфитом натрия, превращающего неметилированный цитозин в урацил и

при последующей репликации ДНК — в тимин и при этом никак не влияющего на метилированный цитозин. Таким образом, возможность обнаружения замены состава CG изучаемой последовательности на TG — это путь к определению в ней содержания 5mC. Наиболее четко это содержание может быть установлено с помощью секвенирования изучаемой молекулы, выявляющего места в молекуле, в которых в результате бисульфитной обработки цитозин превратился в тимин. Однако в зависимости от характера решаемой задачи это различие может быть установлено разными способами, например, по изменению температуры плавления обработанной этим агентом двуспиральной ДНК, претерпевающей уменьшение содержания CG- и увеличение содержания AT-пар. Наиболее распространенным методом выявления особенно на уровне 1—2 динуклеотидов CG является проведение метилчувствительной реакции ПЦР — MSP (*methyl-specific PCR*). В этой реакции используют праймеры, одни из которых специфичны к метилированному сайту, другие — к неметилированному. Если в реакции полимеризации с метилспецифическим праймером появляется амплифицированный продукт, следовательно, изучаемый сайт метилирован, и наоборот. Аналогично получают результат амплификации молекулы в случае использования праймера, специфического к неметилированному сайту.

Другая составная часть инструментария, применяемого при изучении характера метилирования геномных последовательностей, — использование разрезающих ДНК по определенным местам рестрикционных эндонуклеаз, составляющих изошизомерные пары. Они узнают один и тот же сайт разрезания, но одни из них разрезают сайт в любом случае, другие — только в том случае, если сайт не метилирован. Эти последние составляют группу метилчувствительных рестриктаз.

Одним из методов, использующих такие рестриктазы, является метод сканирования на уровне всего генома состояния метилирования рестрикционных сайтов, включающих CpG-островки. Он получил название *restriction landmark genomic scanning* — RLGS. С помощью этого метода можно выявить, какие гены метилированы aberrантно при тех или иных патологиях или проявляют отклонения от нормальной картины метилирования. Для этого нормальную и опытную ДНК режут на большие куски с помощью метилчувствительной рестриктазы, к фрагментам пришивают радиоактивную концевую метку, переваривают с помо-

щью метилнечувствительной рестриктазы и разгоняют в электрическом поле. После обработки с помощью мелкощепящей рестриктазы полученных агарозных гелей фрагменты переносят в полакриламидный гель и проводят форе́з в направлении, перпендикулярном первому форе́зу. При этом сигналы, выявляемые в сравниваемой ДНК нормы и их отсутствие в случае ДНК патологического материала, обнаруживают aberrантно метилированные гены, которые могут быть идентифицированы с помощью секвенирования. Более того, по интенсивности получаемого сигнала образующихся фрагментов можно изучать изменения в копийности исследуемой последовательности генома.

Другой метод эпигенетических исследований — *differential methylation hybridization* — ДМН. Он основан на выявлении различий результатов, например гибридизации обогащенной CpG-элементами фракции ДНК изучаемого генома с молекулами ДНК того или иного его определенного участка. При этом такие молекулы берутся как в исходном виде, так и после их разрезания с помощью фермента, реагирующего на присутствие в сайте метильной группы. Для получения таких отдельных участков генома выделенную геномную ДНК ферментативно режут на отдельные куски и к ним пришивают линкерную, или адапторную, ДНК. Она содержит область, гибридизующуюся с универсальным праймером, с которого начинается амплификация фрагмента — многократное повторение по матрице данного участка генома реакции полимеризации (PCR — полимеразная цепная реакция). Таким образом, различные участки генома могут быть получены в виде PCR-ампликонов. Если для получения таких ампликонов использовали ДНК, не обработанную метилнечувствительной рестриктазой, гибридизация амплифицированных молекул с CpG-островками геномной ДНК оказывалась высокоэффективной. Если же изучаемую ДНК предварительно обработать метилнечувствительной рестриктазой, которая разрежет неметилированные сайты так, что эти молекулы не смогут участвовать в реакции ПЦР и образовывать соответствующие ампликоны, то эффективность гибридизации с CpG-фракцией геномной ДНК резко снизится. Результаты дифференциального поведения ампликонов изучаемой ДНК, полученных до и после их обработки метилнечувствительной рестриктазой и соединенных с флуоресцентной меткой, могут быть получены при использовании микрочипов. Они представляют собой носители организованных в ряды различных обогащенных CpG-островками последователь-

ностей генома, каждая из которых закреплена в определенном месте носителя. Появление метилированных сайтов в тех или иных последовательностях генома изменяет картину распределения флуоресцентных сигналов на используемом микрочипе. Выявление места флуоресцентного сигнала на микрочипе позволяет идентифицировать, с каким геном связано наблюдаемое изменение в характере метилирования генома в изучаемом случае.

Охарактеризуем еще один часто используемый в эпигенетических исследованиях метод выявления различий распределения метильных групп в разных участках генома — *Methylation-Sensitive-Representational Difference Analysis* (MS-RDA). Он особенно необходим при поиске ответа на вопрос, связаны ли наблюдаемые эффекты с изменениями состояния метилированности в самом гене, или, возможно, в каком-то его окружении либо вообще в каких-то других участках генома, влияющих на выражение изучаемого гена. При работе с помощью этого метода сравниваются два генома, функционирующие в нормальных и каких-то экстремальных условиях. Ясно, что в основном геномы будут метилированы похоже, но в некоторых местах могут возникать различия. Как их определить? Для этого выделяют ядерную ДНК, переваривают ее с помощью метилчувствительной рестриктазы, соединяют с линкером, гибридизующимся с универсальным праймером и получают PCR-ампликоны. Ясно, что среди них будут такие, которые выявляются только в случае экстремальной ДНК и отсутствуют в материале из нормальных условий. Как их определить? Для этого полученные ампликоны разрезают с помощью метилчувствительной рестриктазы и только к тем из них, которые получены в случае экстремальных условий, присоединяют новые последовательности линкерной ДНК, узнающие новый праймер. Затем небольшое количество этого материала смешивают с большим избытком фрагментов нормальной ДНК и молекулы такой смеси подвергают плавлению и ренатурации. Это приводит к тому, что участки генома, которые и в нормальной, и в экстремальной ДНК метилированы одинаково, образуют гетеродуплексы, одна нить которых представлена первой, другая — второй ДНК. Если же в экстремальной ДНК какой-то участок генома теряет 5mC и будет разрезан в отличие от ДНК нормы, то при ренатурации он будет замыкаться на свою же комплементарную одноцепочечную последовательность, и, следовательно, будет обнаружен в составе гомодуплекса, сохраняющего идеальную конфигурацию для праймирования ПЦР. Такие гомодуплексы в отличие от гетеродуплек-

сов являются предпочтительным субстратом для ПЦР. 2—3-кратное осуществление таких процедур позволяет накопить нужный материал и изучить геномную область аберрантного метилирования, имевшего место в тех или иных экстремальных для данного организма условиях.

9.5. ХЕМОУСТОЙЧИВОСТЬ СВЯЗАНА С ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ БОЛЬШОГО ЧИСЛА ГЕНОВ

Изучение с помощью описанных методов состояния метилирования различных последовательностей генома при нормальном функционировании и при различных отклонениях от нормы вскрыло удивительную закономерность: резкому изменению этого состояния подвергаются клетки при их злокачественном перерождении и при развитии устойчивости к действию различных лекарств.

Для этих двух явлений характерно общее: они определяются функциональным состоянием не одного какого-то гена, а многочисленной их группой. Так, фирма Superarray Bioscience Oligo GEArray, специализирующаяся на создании микрочипов ДНК, представляющих гены сгруппированно относительно того или иного биохимического пути, изготавливает микроэрреи для токсикологических исследований и для определения лекарственной устойчивости изучаемых клеток. Эти микроэрреи позволяют изучать состояние в клетке 263 генов, кодирующих белки, составляющие различные семейства. Они охватывают процессы детоксикации различных веществ, их транспорта в клетке, ответа на стресс, включающего репарацию ДНК, и запуск программы либо на выживание клетки, либо ее апоптоз. Важна возможность изучения состояния генов различных шаперонов и белков теплового шока, транскрипционных факторов и регуляторов транскрипции, а также регуляторов протекания клеточного цикла.

Большое значение на пути изучения механизмов лекарственной устойчивости имеет обнаружение зависимости чувствительности клетки к химиотерапии от изменений уровней экспрессии большого числа генов и интенсивности транскрипционных процессов в клетке [18, 20]. Эти изменения указывают на возможность тех или иных отклонений в координированности работы соответствующих генов, характерной для клетки, чувствительной к химиотерапии. При разбалансированности работы этих генов возникает тот или иной механизм устойчивости к действию лекарственных средств.

Таким образом, важно установление профиля активности соответствующих генов в чувствительной клетке и того, как он изменяется при возникновении в ней хемотройчивости. Возможно, среди этой группы генов одни могут оказаться более, другие — менее критичными для определения фенотипа хемотройчивости. Более того, при изменениях интенсивности транскрипционных процессов в клетке становится возможным и изменение локализации в клетке продуктов таких генов, а отсюда изменение условий функционирования этих продуктов может отразиться на их структуре и функции, и это способно повлиять на проявление фенотипа хемотройчивости клетки. Действительно, продукты генов работают в клетке не сами по себе, а вовлекаются в сеть взаимодействий, представляющих специальные образования, которые получили название интерактом. В настоящее время установлено, что каждую интерактому характеризует порядка 650 тыс. связей [21], возможные изменения которых отражаются на проявлении клеткой того или иного фенотипа. Используемый подход поштучного изучения этих связей и их роли в определении фенотипа — это низковероятностный подход, необходимо развитие новых, скорее всего биоинформативных технологий, позволяющих количественное и качественное изучение такого числа связей и их корреляций с проявлением клеткой того или иного фенотипа. На настоящем же этапе развития исследований в данной области возможно изучение профиля экспрессии различных генов как в чувствительной, так и в устойчивой клетке на трех различных уровнях. Это уровни всего генома, полного белкового состава клетки, или протеома, а также кинома, или профиля активности генов протеинкиназ, специфически модифицирующих те или иные белки, тем самым определяя их функциональное состояние. Результаты таких исследований, возможно, и позволят выявить наиболее критические факторы зависимости проявления клеткой фенотипа от условий функционирования. Это могло бы значительно облегчить поиск пути преодоления хемотройчивости.

От чего же зависит интенсивность транскрипционных процессов в клетке? Как указывалось ранее, установлены многочисленные генетические факторы этой зависимости, и в настоящее время активной областью исследований становится изучение эпигенетических факторов. Оказалось, что приобретение клеткой фенотипа хемотройчивости (как и развитие злокачественности клетки) ведет к изменению экспрессии сотен генов за счет изменения лишь характера их метилирования [22]. Идентификация этих генов представляет интерес, и многие исследователи

сосредоточились на изучении этой проблемы. В качестве примера приведем работы [23, 24]. В них сравнивались профили экспрессии генов чувствительной исходной линии клеток, полученных из опухоли молочной железы человека, и этих же клеток, приобретших устойчивость к таким средствам химиотерапии, как доксорубин и цисплатин. Оказалось, что наряду с изменениями в работе эпигенетических механизмов, которые обуславливают утрату триметилирования в молекулах гистона H4, усиление фосфорилирования гистона H3, уменьшение экспрессии гена одной из гистоновых метилтрансфераз, снижается уровень метилирования тотальной ДНК и резко изменяется характер метилирования последовательностей ДНК в специфических районах генома.

Известно, что характерные уровни в модификации цитозина в ДНК, выражающиеся соответственно как гипо- и гиперметилирование различных районов генома, определяют фенотип злокачественности клетки [25]. Он связан как с усилением экспрессии онкогенов, что происходит при их гипометилировании, так и вообще с выключением работы генов онкосупрессоров, сдерживающих пролиферацию раковых клеток. Выключение генов онкосупрессоров происходит за счет гиперметилирования CpG-островков, находящихся в промоторах этих генов и, следовательно, успех антираковой терапии связывают с возможностью активации этих молчащих при раке генов. Как состояние гипо- и гиперметилирования ДНК определяет фенотип хемоустойчивости клетки? На этот вопрос еще предстоит дать обобщенный ответ, в настоящее время идет накопление необходимых данных. Так, в работе [23] показано, что возникновение хемоустойчивости культуры клеток рака молочной железы связано с изменениями в уровне метилирования и вытекающей отсюда активности генов, определяющих работу трех механизмов: регуляции активности генов, вовлеченных в метаболизм эстрогена, осуществление программы, приводящей клетку к апоптозу, и программы, обуславливающей взаимодействие клетка—клетка.

Если изменение в рисунке метилирования генов чувствительной к химиотерапии клетки влияет на экспрессию генов, среди которых могут оказаться такие, от которых зависит фенотип хемоустойчивости, то изучение aberrантности метилирования генов устойчивой клетки — это путь к идентификации генов, критичных для проявления данного фенотипа. Такой подход осуществлен в работе [26]. Авторы использовали панель из 60 линий опухолевых клеток, для которых было изучено с помощью бисуль-

фитной техники ПЦР-реакции состояние CpG-островков промоторов 32 генов. Оказалось, что уровень ненормального метилирования выбранных мишеней варьировал в этих линиях от 2 до 81 %. Определялась связь соответствия выявляемого профиля метилирования в данных клетках и их чувствительности к действию приблизительно 30 тыс. различных лекарств. Проведенная работа позволяет выявлять маркеры метилирования по отношению к действию той или иной химиотерапии. Оказалось, что при гиперметилировании промотора гена p73, гомолога гена p53 резко повышается чувствительность клеток к действию алкилирующих соединений и, таким образом, продукт этого гена — это критический фактор возникновения устойчивости и к такому одному из наиболее распространенных средств химиотерапии, как цисплатин. Выключение этого гена с помощью RNAi подтвердило наблюдение, связанное с aberrантностью его метилирования.

Изучение профилей метилирования генов в норме и при различных патологиях указало на то, что метилирование осуществляется не хаотично, а по какому-то плану, являясь, очевидно, одним из регуляторных клеточных средств. Итак, по сравнению с каким-то характерным для данной клетки стандартом метилирования нуклеотидных последовательностей может осуществляться в зависимости от соответствующих условий как гипо-, так и гиперметилирование в основном CpG-островков промоторов генов. Такие различия в метилировании называют метилаторным фенотипом [27] (по аналогии с мутаторным фенотипом [28]). Почему и когда происходят эти события, еще предстоит установить.

В настоящее время наиболее активной областью исследований является изучение действия малых молекул, способных изменять статус метилирования генов функционирующей клетки. Наибольший прогресс связан с исследованием молекул, выступающих в роли деметилирующих агентов. Поскольку модификация цитозина в отличие от замены основания в молекуле ДНК может носить обратимый характер, то для сохранения связанных с метилированием генов функциональных особенностей клетки важно сохранение в клетке активности ДНК-метилтрансфераз. Применение же ингибиторов этих ферментов обусловит эффект деметилирования нуклеотидных последовательностей, что и изменит функциональные свойства клетки. Исследования сосредотачиваются на таких ингибиторах ДНК-метилтрансфераз, как аналоги цитидина 5-азацитидин и 2'-деокси-5-азацитидин (децитабин — *decitabine*) [25, 33—35]. Эти аналоги способны встраиваться в молекулу ДНК,

и ДНК-метилтрансферазы узнают их и взаимодействуют с ними так, что это выводит фермент из строя, приводя к образованию аддуктов. Последние узнаются и обрабатываются ферментами репарации так, что аддукт вырезается из молекулы ДНК и подвергается протеасомной деградации. Это как бы очищает клетку от содержания в ней метилирующих ферментов, лишает ее метилтрансферазной активности, и уровни метилирования геномных последовательностей снижаются. В истории изучения этих деметилирующих агентов отмечается два периода: ранний, менее результативный, использующий высокие концентрации этих ингибиторов, и более результативный поздний, использующий низкие их концентрации. Как выяснилось позже, при высоких концентрациях вызываемые эффекты обусловлены в основном токсическим действием этих веществ, при котором эффект деметилирования генов нивелируется, иными словами, вместо улучшения клинической картины, обусловленного эффектом деметилирования, наблюдается ухудшение, связанное с токсичностью деметилирующего агента. При низких концентрациях выравниваются и совмещаются уровни встраивания аналогов оснований в ДНК и стехиометрии работы репарационного аппарата клетки, чем и достигается технически элегантно освобождение клетки от присутствия нежелательных в той или иной функциональной ситуации ферментов метилирования и проявления ими активностей.

Применение деметилирующих малых молекул в качестве антираковой терапии привлекло большое внимание в связи с теоретически обоснованной возможностью снятия гиперметильного блока с экспрессии генов онкосупрессоров. Если снятие с цитозина метильных групп приводит к экспонированию мест посадки соответствующих транскрипционных факторов и облегчается привлечение РНК-полимеразы II к этой области транскрипции, то восстановление молчащей функции онкосупрессора дает клетке шанс для снижения ее злокачественности. В рамках этой стратегии сделано важное наблюдение относительно того, что еще больший эффект действия деметилирующих агентов, активирующих выражение генов онкосупрессоров, оказывает одновременное подавление с помощью различных ингибиторов активности гена гистоновой деацетилазы — HDAC. Этот фермент, удаляя ацетильные группы с лизиновых остатков молекулы гистона, увеличивает ее положительный заряд, и тем самым усиливает взаимодействие гистона с ДНК, при котором уменьшается необходимая

при выражении гена степень свободы ДНК. Если же фермент HDAC инактивирован и не удаляет ацетильные группы с остатков лизина, то гистоны не способны связываться с ДНК и эффективность транскрипции генов повышается. Таким образом, одновременное подавление активности ДНК-метилтрансферазы и гистонацетилтрансферазы позволяет выигрывать в коэффициенте полезного действия этих ферментов как средств, способствующих восстановлению утраченной функции онкосупрессора.

В последнее время в изучении условий, регулирующих экспрессию того или иного гена, внимание привлекает и такой фермент, как гистоновая лизинспецифическая деметилаза-1 (LSD-1). Известно, что при действии этого фермента лизиновые остатки молекулы гистона H3 лишаются метильных групп и ацетируются, что отражается на изменении состояния хроматина в соответствующих участках генома. Оказалось, что при действии на клетку в случае лимфомы Беркитта таких антираковых препаратов, как помалидомид и леналидомид резко увеличивается количество белка p21WAF-1 в ней [29]. Как уже указывалось, этот белок ингибирует циклинзависимые киназы, активность которых обуславливает протекание цикла клеточных делений и размножение раковых клеток. Следовательно, остановки роста раковых клеток можно достичь при увеличении количества этого белка в клетке, и это происходит при действии указанных антираковых препаратов. В чем же заключается их действие? На основании полученных результатов авторы работы [29] предположили, что LSD-1 принимает участие в активации промотора гена p21^{WAF-1} потому, что при отсутствии в клетке этой деметилазы синтез белка p21WAF-1 не возрастает. Изучаемые препараты активируют деметилазную и ацетилазную активности LSD-1, узнающей молекулу гистона H3 в сайте K9 так, что состояние структуры хроматина в области промотора гена p21WAF-1 изменяется и доступ транскрипционных факторов к GC-сайтам улучшается, так же, как и привлечение РНК-полимеразы II. При таких условиях повышение содержания белка p21WAF-1 становится возможным. Таким способом могут быть снижены безудержное включение клеточного цикла и рост опухоли.

Изучение гистоновых лизинспецифических деметилаз привлекает в последнее время повышенное внимание. Так, с помощью вставочного мутагенеза на основе встраивающейся в различные участки генома лентивирусной конструкции, содержащей сильный промотор, который усиливает экспрессию нижележащих ге-

нов, было установлено следующее [30]. Увеличение экспрессии гена деметилазы, деметилирующей молекулу гистона H3 в сайте K36, приводит к ингибированию и невозможности связывания с ДНК такой сигнальной молекулы клетки, как ядерный фактор NFκB, отвечающий за возможность экспрессии ряда генов. Таким образом, эта названная FBXLП-деметилаза, содержащая специальный мотив, состоящий из 40 аминокислот, которые относятся к классу белков, называемых *F-box leucine-rich protein*, является негативным регулятором такого транскрипционного фактора, как NFκB. Оказалось, что мутация в определенном сайте гена этого фермента приводит к утрате как деметилазной активности этого фермента, так и его способности ингибировать NFκB.

Как использование деметилирующей терапии отражается на проявлении клеткой фенотипа чувствительности или устойчивости к действию химиотерапии? Этот поставленный в настоящее время вопрос еще требует своего целенаправленного и систематического изучения, получения и обобщения большого количества экспериментальных результатов. Эту работу еще предстоит выполнить. В момент же написания книги речь должна пойти о двух предостережениях. Одно из них связано с возможностью деметилирования промотора, например гена белка p73 как позитивного регулятора гена O⁶-метилгуанинметилтрансферазы (MGMT), репарирующей геном от действия алкилирующих агентов и, в частности, действия такого широкоиспользуемого антиопухолевого средства, как цисплатин. Ясно, что при усилении экспрессии гена MGMT за счет действия его позитивного регулятора p73 клетка будет эффективнее репарировать повреждения генома, вызванные алкилирующими соединениями, и, таким образом, проявлять устойчивость к их действию, обуславливающую неэффективность их использования как лекарственных средств.

Второе предостережение касается возможности изменения состояния метилирования участков генома, которые могут вовлекаться в процессы эктопической гомологической рекомбинации. Это повторяющиеся последовательности ДНК, расположенные в разных областях генома. Этот вид рекомбинации является фактором пластичности генома, в результате которой может возникать и такое нежелательное явление, как анеуплоидия. Для предотвращения этого в клетке имеется ряд средств, позволяющих контролировать такие события: пространственный монтаж генома в детерминированной архитектуре ядра; степень свободы генетического материала, ограниченной рамками хромосомной террито-

рии и состояние метилированности последовательности, которое способно ограничивать ее рекомбинационную активность. Если в природе важно действие всех трех факторов, то не приведет ли выключение при действии деметилирующих агентов одного из них — метилирования — к повышению вероятности возникновения анеуплоидии? Предстоит найти ответ на этот вопрос.

Итак, на уровне молекулярной организации клетки удалось достичь значительного прогресса в изучении причин и следствий работы того или иного молекулярного механизма, способного определить фенотип хемоустойчивости. Наряду с необходимостью соблюдения закона о строгой локализации в клетке генетического материала важна работа механизма, связанного с проявляемым клеткой фундаментальным регуляторным свойством изменять обратимые химические модификации на генетическом уровне в зависимости от условий своего функционирования и состояния молекулярных систем, обеспечивающих ее жизнеспособность. Использование принципа эпигенетических изменений, или внесения в гены таких обратимых химических модификаций позволяет клетке изменять профиль экспрессии одновременно большого числа генов и, таким образом, определять возможность проявления клеткой того или иного фенотипа, возникающего в данное время в данном месте. Ясно, что при различных патологиях возникает необходимость контроля за возможностью возникновения того или иного фенотипа.

Отличительной чертой механизмов хемоустойчивости оказалось их исключительное разнообразие, создающее большие технические сложности в практической работе клиницистов [21]. В связи с этим в последнее время большое внимание привлекают возможности использования так называемых грязных лекарств [31], или лекарств немишенного типа, а также манипуляций с клеткой на наноуровне с применением искусственных наноконструкций, наночастиц, предназначенных для различных целей в решении проблем биологии клетки. В следующей главе рассмотрим характеристику и возможности нанобиологии.

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ НАНОБИОТЕХНОЛОГИИ В РЕШЕНИИ ПРОБЛЕМ ХЕМОУСТОЙЧИВОСТИ

Охарактеризуем кратко основы нанобиотехнологии, которая предоставляет в первую очередь возможности целенаправленной доставки фармакологических средств воздействия на клетку. Это позволяет эффективно обеспечивать защиту здоровых клеток от токсического действия лекарства и самого лекарства от действия организма, а также повышение концентрации действующего начала в предназначенных местах их действия. Более того, использование такой технологии дает возможность прижизненной визуализации состояния клетки и ее отдельных частей, вплоть до отдельных молекул. Выявление визуальных отличий между чувствительной и устойчивой клетками может значительно ускорить и облегчить прохождение пути преодоления лекарственной устойчивости клетки. Использование наночастиц также повышает эффективность получения иммунных сывороток за счет неизменности состояния и более длительного пребывания антигена в иммунизируемом организме.

В поступательном движении развития человечества выделяют такие четыре основных периода познания и его практического использования: период натуральной жизни, сменившийся периодом научно-технической революции, который перерос в информационное управление реальностью, открывшее возможности четвертого периода как раскрытия потенциала структур наноразмера (одна миллиардная часть метра как единицы размера). На пути приобретения знаний человеку предстояло овладеть, с одной стороны, законами макромира с его мегаразмерами (возможно, Вавилонскую башню можно рассматривать как первую попытку получения необходимых знаний на пути изучения мегаразмеров). С другой стороны, раскрытие законов и основ строения невидимого материального мира и овладения этим микромиром сформировали мышление и специальные исследования на уровне атомов и субатомных частиц. Их размер измеряется в ангстремах, что

примерно на порядок меньше наноуровня. Однако оказалось, что именно на наноуровне компактизаций материи могут возникать структуры, приобретающие определенные свойства, которые могут выполнять ту или иную функциональную роль. Считается, что первым обоснованием необходимости изучения и манипуляций со структурами материального мира на наноуровне является прочитанная в 1959 г. лекция физика Ричарда Феймана «Места на дне хватает» («There's Plenty of Room at the Bottom»). В 1987 г. Эрик Дрекслер выпустил книгу под названием «Двигатели Творения» (E. Drexler «Engines of Creation»). Она заложила фундамент для развития новой дисциплины, широко известной в настоящее время как нанотехнология. Последователь Дрекслера Олберт Фрэнкс (Albert Franks) определил эту область как исследование структур в диапазоне 0,1–100 нм [1]. (Ранние работы по получению наночастиц приведены в статье [2].) Отметим, что в 1952 г. советские физики Л. Радушкевич и В. Лукьянович первыми опубликовали результаты получения углеродных структур размером 50 нм, имеющих форму трубки, «О структуре углерода, образующегося при термическом разложении окиси углерода на железном контакте» (Журн. физ. химии. — 1952. — 26. — С. 88–95). Представлена информация по различным разделам этой области, включая *nanotechnology in fiction*, *nanotech age*, *nanobiotechnology* и *nanomedicine*. Мы преследуем цель суммировать достижения нанобиотехнологии и наномедицины, касающиеся открывающихся возможностей доставки в организме лекарств по месту назначения их действия, оптимизации действия этих лекарств и повышения эффективности их действия, что особенно важно при решении проблемы хемоустойчивости.

Прежде всего, для внесения в организм лекарства с использованием наноструктур необходимо решить проблему получения соответствующих наноструктур, наночастиц, изучить их поведение в организме, а также поведение самого организма в случае попадания в него наночастиц. Ясно, что при использовании в медицине эти частицы должны быть биологически инертными, нетоксичными, подвергаться биодеградации и выводиться из организма, не отражаясь на системах его функционирования.

Начался поиск, изучение материалов и способов приготовления необходимых наночастиц, отвечающих выдвигаемым требованиям. Отметим, что на этом пути исследования свойств и манипуляции с молекулами ДНК, которые характеризуются наноразмерами [3], обусловили интерес к различным синтетическим

полимерным материалам, а также к материалам неорганического происхождения.

Оказалось, что возможно получение наночастиц в самом широком диапазоне наноразмеров, которые по своим структурным свойствам можно разделить на соответствующие классы. Кратко охарактеризуем эти классы.

10.1. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОВРЕМЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ

Эти частицы можно разделить на два класса: те, которые используются просто в качестве носителей для доставки лекарств в организме к специальным местам их действия, и те, с помощью которых можно визуализировать доставку лекарства в клетки, а также появление в клетке какой-либо маркерной молекулы. На рис. 10.1 (см. вклейку) приведено схематическое строение наиболее распространенных типов наночастиц, использующихся в настоящее время [1].

Что касается биodeградируемых полимеров, то на их основе могут быть получены коллоидоподобные нанополлики и нанокансулы. На первых частицах лекарство может просто как-то физически распределяться по полимерной массе шарика, в нанокансулах же, представляющих собой пузырьки, оно заключается в полость, окруженную полимерной мембраной. Размер этих частиц в зависимости от способа приготовления может варьировать в пределах 10—1000 нм. (Отметим, что очень грубо диаметр капилляров в организме человека составляет порядка 10 мкм.) Оказалось, что способные проходить через самые тонкие капилляры наночастицы могут входить в клетки различных тканей, при этом в каждом конкретном случае существует определенный оптимальный размер этих частиц [4—7]. При работе с наночастицами, преследующей цель доставки их в соответствующий компартмент клетки, необходимо преодолеть в организме два барьера. Прежде всего, захват этих частиц ретикуло-эндотелиальной системой (*reticulo-endothelial system* — RES). Ее составляют клетки, обладающие способностью поглощать различные попадающие в организм частицы и обособлять их в клетке, нейтрализуя тем самым возможность их влияния. К этим клеткам относятся макрофаги и их предшественники, специализированные клетки эндотелия, выстилающие пазухи печени, селезенки, костного мозга, а также ретикулярные клетки лимфатических тканей (макрофаги) и костного мозга (фибробла-

сты). Ясно, что проблема доставки лекарства в клетки системы RES имеет более простое решение по сравнению с клетками других тканей.

Второй барьер на пути доставки наночастиц к наиболее часто используемым метаболическим мишеням цитоплазматического компартмента представляет собой эндоцитозно-лизосомный компартмент клетки, также влияющий на возможности свободных движений наночастиц в клетке и сохранения их структуры. Уже в ранних исследованиях показано, что наночастицам, полученным на основе поли-dl-лактида-ко-гликолида (PLGA), а также полилактида (PLA) удается избежать эффектов эндосомно-лизосомного действия и быстро поступать в цитоплазматический компартмент [8]. Самое широкое изучение различных структур наночастиц представляло интерес. На этом пути были установлены такие классы наночастиц, как полимерные мицеллы, дендримеры, липосомы, частицы на основе неорганических материалов (железа, кремния, алюминия, титана и др.), а также углеродные трубки. Опишем основные свойства этих структур.

Полимерные мицеллы могут формироваться в водных растворах из блоков различных полимеров, обладающих одновременно гидрофильными и гидрофобными свойствами. Наблюдающаяся самосборка в виде центральной (кор) и периферических (оболочка) частей блоков из таких кополимеров приводит к образованию стабильных мицелл размером менее 100 нм, которые не диссоциируют в условиях физиологического функционирования. Центр такого мицеллярного образования представлен гидрофобной областью структуры, особенно важной для водонерастворимых лекарств. Гидрофильные сегменты мицелл образуют внешний слой структуры. Благодаря этому мицеллы распределяются в водных средах так, что они могут вводиться в организм внутривенно. Замечательно, что мицеллы настолько малы, что не захватываются клетками ретикуло-эндотелиальной системы и время их циркуляции в кровяном русле значительно удлиняется.

Большое внимание, начиная с 80-х годов прошлого века, привлекли нанообразования, получившие название «дендримеры». Основное свойство этих структур — начинающиеся от центральной малой молекулы или линейного полимера многочисленные ветвления сегментов, образующих дендример. Такое ветвление получается при сополимеризациях с использованием различных связывающих молекул и блоков ветвлений. Эти ветвления позволяют значительно увеличивать число активированных концевых

групп для различных связываний, что дает возможность повышать емкость этих структур как соответствующих носителей. Более того, разветвленная структура образует много впадин и выступов, и это также повышает ее емкость как носителя так, что лекарство может быть не только прикреплено к поверхностным группам дендримера, но и заполнять его внутреннюю часть. Ясно, что такая структура представляет особенно большой интерес при использовании лекарств, отличающихся повышенной токсичностью, например использующегося в химиотерапии рака 5-фторурацила. Внесение его в организм в виде конъюгата с ацетилированным дендримером после высвобождения из этой конструкции при попадании в клетку за счет гидролиза значительно снижало токсичность данного лекарства [9].

Обнаруженный еще в 1969 г. факт, что изолированные липидные компоненты мембран клеток способны к образованию сферических пузырьков из натуральных материалов, привлек интерес к изучению и манипуляциям этими структурами при решении различных задач [10]. Эти структуры получили название липосом. Оказалось, что в зависимости от состава используемых фосфолипидов и холестерина могут быть получены как однослойные, так и многослойные пузырьки с разными наноразмерами и разным поверхностным зарядом, которые определяют различные свойства липосом. Среди этого класса наночастиц легко получить особо малые частицы диаметром 25–50 нм. Более того, поверхность липосом может быть эффективно изменена с помощью присоединения к липидному слою групп полимера полиэтиленгликоля (ПЭГ) — PEG-единиц (эта технология получила название пегилирования — *pegilation*). Такое изменение стабилизирует липосомы и продлевает время их циркуляции в крови.

В качестве наноносителей лекарств и биологических материалов привлекают внимание материалы неорганического происхождения. Сферические керамические наночастицы размером менее 50 нм биологически инертны, не набухают в водных растворах, прочно удерживают сорбированный на них материал и демонстрируют свою пригодность для выполнения биологических задач. Аналогичными свойствами обладают наночастицы, приготовленные из алюминия и титана [1]. Интересно отметить, что в глубокую старину существовал обычай использовать при различных заболеваниях порошок малахита [11]. Несмотря на отсутствие каких-либо технологических данных, позитивный лечебный эффект такого приема, очевидно, наблюдался и, возможно, этот эффект

мог быть обусловлен свойствами образующихся из малахита наночастиц. Они могли лучше разносить по организму питательные вещества и различные действующие начала съедобных растений.

Один из наиболее изучаемых наноматериалов — так называемые углеродные трубки. Отметим, что при работе с графитом в вакууме, при воздействии лазеров, при высоких температурах и высоких давлениях (условия образования бриллиантов) можно получать сверхпрочные цилиндрические углеродные молекулы, которые могут достигать по длине нескольких миллиметров, диаметр же их внутренней образующейся полости составляет порядка нескольких нанометров. В настоящее время получены результаты, показывающие возможность попадания этих частиц в клетки [12]. Эти трубки привлекают внимание как средства целенаправленной доставки запечатанного в такой трубке лекарства (особенно, например, такого токсичного, как томифлю против вируса гриппа) непосредственно к месту его действия с последующим открыванием трубки лишь в мишеных клетках, что не отражается на состоянии немисшеных структур организма. Такие попытки предприняты в работах [13—15]. Однако следует отметить, что на пути их практического применения актуальны результаты углубленного изучения токсичности таких наноструктур. Так, в публикации ежегодных конференций Американского общества исследований рака (AACR) за 2007 г. в работах Sara Pacheco была показана возможность образования разрывов в молекуле ДНК под действием водных коллоидов кремния и материалов из C-60 фуллерена, образующего углеродные трубки. Образование разрывов в ДНК чревато возникновением злокачественных опухолей.

Итак, если наночастицы — это эффективные средства снабжения организма необходимыми лекарствами, то возникает вопрос о способах селективной доставки их в организме. Рассмотрим этот вопрос детальнее.

10.2. О СПОСОБАХ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ В ОРГАНИЗМЕ НАНОЧАСТИЦ

Такая доставка может осуществляться как пассивно, так и активно. Почему в случае определенных патологий в организме возможен пассивный транспорт используемых лекарственных средств? Это объясняется физиологическими особенностями организма. Оказалось, что возникновение патологии определяет качественное изменение состояния сосудов. Так, если поры в слое

эндотелия кровяных сосудов большинства здоровых тканей составляют порядка 2 нм (и 6 нм при переходе капилляров в вены), то в сосудах, снабжающих кровью опухоль, размер этих пор увеличивается от 100 до 780 нм [16]. Такие же изменения наблюдаются в сосудах при некоторых воспалительных процессах. Таким образом, попавшие в организм наночастицы, несущие на себе то или иное лекарство, не смогут эффективно попадать в клетки здоровых тканей (как зачастую и само лекарство), в участках же поражения они будут селективно накапливаться из-за образующейся рыхлости сосудов. Такое наблюдающееся на практике явление селективного накопления и удержание противораковых средств в опухолях даже получило специальное название ЭПР (EPR — от *enhanced permeation and retention*) [17, 18]. Задержка же лекарства, проникшего в клетки опухоли, обусловлена ухудшением лимфатического дренажа, наблюдающегося в злокачественных образованиях. Однако имеются результаты, показывающие, что явление ЭПР отмечается в основном на периферии опухоли и ее центр является труднодоступным участком, что отражает термин «*binding site barrier*» [19].

Японские авторы впервые провели исследования клеток кровеносных сосудов, снабжающих опухоль кровью. Считалось, что в отличие от злокачественных клеток с ярко выраженной геномной нестабильностью, геном эндотелия сосудов не должен подвергаться каким-либо изменениям. Однако в цитогенетических исследованиях с помощью метода FISH (*fluorescence in situ hybridization*) при использовании в качестве зондов последовательностей 7-й и 8-й хромосом человека была выявлена анеуплоидия, в то время как клетки сосудов из здоровых тканей всегда были диплоидными. Более того, при изучении этого явления на мышцах обнаружено, что при сравнении клеток, содержащих и не содержащих такой часто выявляемый при раке маркер, как трансмембранный гликопротеин CD 133, в первом случае анеуплоидия выявлялась чаще [20]. Возможно, разрыхление сосудов, наблюдающееся при раке, связано с обусловленными анеуплоидией биохимическими изменениями. Такое же явление при различных воспалительных процессах также, по-видимому, связано с подобными биохимическими изменениями и представляет интерес установить, лежит ли в их основе анеуплоидия или что-то другое.

Что касается возможности активной доставки наночастиц, нагруженных соответствующим лекарством, то решение этой проблемы открывают инженерные способы специфической функ-

ционализации поверхностей наноносителей с помощью соответствующих лигандов, которые узнают и связываются со своими рецепторами, экспонированными на тех или иных клетках. Ясно, что такие клетки выступают в качестве мишеней действий комплексов наноносителя с лекарством.

Инженерному изменению можно подвергнуть поверхность наноносителя с помощью лигандов, которые способны обеспечивать либо прохождение комплекса наночастица—лекарство внутрь клетки (интернализующие лиганды), либо только наружное прикрепление этого комплекса (неинтернализующие лиганды). В случае интернализирующих лигандов их взаимодействие с поверхностными рецепторами клетки индуцирует реакции эндоцитоза так, что из компонентов клетки, включающих клатрин и специализированные белки, образуются специальные эндосомы. Их содержание обязательно подвергается действию такой органеллы клетки, как лизосома. Ее задача состоит в том, чтобы в достаточно жестких условиях переварить все, что может представлять угрозу для безопасности клетки. В этом компартменте возможна дезинтеграция комплекса наночастица—лекарство с последующей диффузией высвободившегося лекарства из лизосомы в цитоплазматический компартмент. Показано, что такие лекарства, как доксорубин выдерживают лизосомную обработку, иными словами, способны пройти эндосомно-лизосомный барьер [16].

Неинтернализующий лиганд может лишь направлять в организме комплекс наноносителя с лекарством к нужному месту действия, а за счет особых условий этого места (например, повышения температуры в участках воспаления, или кислого рН в опухоли) идет быстрая деградация наноносителя так, что внутрь клетки проникает только лекарство. Ясно, что в этом случае повышается вероятность прохождения медикаментом эндосомно-лизосомного барьера. Очевидно, что количество таких особых выявляемых мест в организме и подгоняемых к ним наноносителей может оказаться достаточно ограниченным.

Как же лиганды обоих классов могут быть прикреплены к наночастицам? Это может быть осуществлено с помощью техники, получившей название конъюгации лигандов и наночастиц. Данная процедура может быть выполнена либо в процессе сборки используемого наноносителя, либо после его сборки с помощью химической активации тех или иных химических групп наноносителя за счет, например, ацетилирования компонентов собирающегося комплекса. При этом важно, чтобы навешиваемые лиган-

ды не попадали бы во внутренние участки носителя, а оставались бы на его поверхности. За этим особенно надо следить при навешивании лигандов в процессе сборки носителя.

Оказалось, что некоторые наночастицы, например липосомы, могут включать во время своего образования такие компоненты, которые способны увеличивать в организме время их полужизни. Таким компонентом для липосом оказался ПЭГ. Пэгиллированные липосомы получили специальное название стерически стабилизированных липосом (*sterically stabilized liposomes* — SSL, или *stealthy liposome*). Ясно, что при использовании таких надежных лекарственных носителей важно, чтобы навешиваемые лекарства заняли в приготавливаемом комплексе концевые положения. Отметим, что пэгиллирование наночастиц делает их менее узнаваемыми системой RES, продлевает время их циркуляции в крови в неизменной форме и предотвращает опсонизацию этих структур в крови, связанную с обрастанием этих структур адсорбирующимися на них многочисленными белками крови.

Какие молекулы используются в качестве лигандов, определяющих маршруты движения лекарства в организме? Для достижения такого результата использование антител, узнающих специфически локализованные те или иные антигены, имеет больше преимуществ. С этой целью используют моноклональные антитела — Mab, продуцируемые гибридомами, в которых способная к безудержному делению злокачественная клетка слита с нормальной, но все время подстегиваемой к размножению клеткой, продуцирующей антитела так, что образуется только один тип этих молекул в отличие от поликлональных антител, образующихся в целом организме. Однако было выявлено, что наноносители с прикрепленными целыми молекулами Mab скорее выводятся из крови, так как в них присутствует F_c -фрагмент, который связывается с F_c -рецепторами фагоцитов, что обуславливает быстрое выведение наночастиц из крови за счет функционирования барьера RES. Наиболее эффективная дериватизация (изменение структуры) поверхности нужных наноносителей осуществляется на основе таких сегментов молекулы Mab, как фрагменты Fab' и F_v [16].

На пути поиска лигандов, обуславливающих адресное движение наночастиц в организме, внимание привлек трипептид, получивший специальное название RGD, представленный последовательностью аргинин—глицин—аспарагин. Оказалось, что такой пептид можно было бы назвать молекулярным клеем, способным скреплять клетки друг с другом и с внеклеточным матриксом за

счет взаимодействий специальных клеточных рецепторов интегринов. Эти белки обладают способностью вступать во взаимодействие с поверхностно экспонированными лигандами RGD различных мембранных белков. Патологические состояния, возникающие в организме, могут отражаться на состоянии интегринов тех или иных клеток, а отсюда и различия в привлечении к ним RGD-покрытых наночастиц. Действительно, оказалось, что при использовании таких покрытых отрицательно заряженных магнитных липосом — сферических пузырьков, содержащих ферромагнитные частицы, лекарство избирательно накапливается в моноцитах и нейтрофилах крови и в их составе способно попадать в мозг [21, 22]. Таким образом, с помощью наночастиц открываются перспективы применения химиотерапии для лечения болезней центральной нервной системы.

Для получения носителей с целью селективной доставки лекарства в организме помимо возможностей иммунобиологии интерес представляет обнаружение неиммунных, способных к взаимодействию с различными белками организма специфических пептидов, локализующихся в организме лишь в определенных местах. На пути обнаружения таких пептидов большое значение приобрела технология использования библиотек пептидов, полученных на основе конструкций различных фрагментов ДНК, вставленных в фаговом геноме в гены, кодирующие белки оболочки фагов. Такие пептиды могут быть найдены на основе клонированных с сохранением рамки считывания соответствующих фрагментов ДНК. Однако они могут быть также обнаружены на основе выявляемого взаимодействия между изучаемым белком-мишенью (или многими такими белками) и данным пептидом полученной библиотеки, представляющей экспрессируемые пептиды оболочки фага. Среди пептидов, изучаемых таким образом, были обнаружены различные пептиды, обладающие способностью проникать в разные клетки [23, 24]. Изучаемые ранее пептиды, обладающие такими свойствами, получили название CPP-пептидов (*cell-penetrating peptides*) [25, 26].

Замечательное свойство этих пептидов состоит в том, что эндоцитоз их в клетки осуществляется не на основании их взаимодействия с ее рецепторами, что приводит к интернализации в клетке этого взаимодействующего комплекса. Следовательно, процесс эндоцитоза в случае CPP не зависит от состояния представленности этих рецепторов на поверхности клетки, а также их сопряжения с включением эндосомно-лизосомного барьера на пути по-

ступления лекарства в цитоплазматический компартмент клетки. Как такие пептиды проникают в клетки еще не ясно, возможно, в разных случаях используются разные механизмы [24]. Оказалось, что для некоторых изученных СРР не выявлялась желаемая селективность относительно мест предназначения их действия [26], в то время как для других пептидов такая селективность наблюдалась [23, 24]. Ясно, что поиск самых различных молекул этого класса как селективных векторов для доставки лекарств в определенные места организма представляет интерес. Проводятся исследования условий и механизмов высвобождения лекарств из состава используемых наноносителей и их диффузии в цитоплазму [27]. В работах [28, 29] показано, что обработка материала при введении в него наночастиц увеличивает эффективность распада комплекса лекарства с наноносителем. В настоящее время четко установлено, что в качестве таких условий может быть использована повышенная температура, возникающая в местах патологии. Также оказалось, что если лекарство привязать к наночастице с помощью ДНК и после введения комплекса в организм использовать электромагнитное поле силой 300—400 кГц (что для организма инертно), то перегреются только наночастицы, ДНК расплавится и оторвет лекарство от наночастицы [30]. Установлено также, что при различных патологиях в тканях организма возникают кислые рН, что делает привлекательным использование особенно интенсивно биodeградирующих наночастиц. Более того, роль низких рН может быть использована с целью создания наноконструкций, способных впрыскиваться в клетки только в условиях кислых рН и не попадающих в клетки при нормальных рН. В настоящее время описано два вида пептидов рНLIP (*pH low insertion peptide*) [31] и PAP-1 пептид [32], которые ведут себя по-разному в условиях разных рН.

Первый пептид накапливается в мембранах только тех клеток, которые находятся в условиях кислого рН, и отсюда рНLIP может доставлять прикрепленные к этому пептиду молекулы лекарств в данные клетки. Отсоединение лекарства от наноносителя происходит за счет гидролиза S—S-связи пептида, что происходит только в том случае, если пептид находится внутри клетки.

Пептид PAP-1 был искусственно спроектирован так, чтобы он смог встраиваться в мембрану клеток только при низком рН. В таком случае этот пептид должен избирательно накапливаться в клетках опухоли. Прикрепление к нему радиоактивного элемента, называемого технециум-99, позволило показать с помощью гамма-

сцинтиграфии в реальном времени продвижение сконструированной наноструктуры в организме и ее преимущественное накопление в опухолях.

Итак, с помощью наночастиц возможна не только эффективная доставка фармакологических средств непосредственно к местам назначения их действия, но и визуализация состояния в клетке, служащей мишенью действия того или иного начала. Кратко охарактеризуем эту возможность.

10.3. О ВИЗУАЛИЗАЦИИ ВНУТРЕННИХ СТРУКТУР КЛЕТКИ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ

Визуализация внутриклеточных структур с помощью различных методов составляет важную проблему в биологии, связанную с изучением биологии клетки, в диагностических целях и при поиске мишеней действия тех или иных лекарств, а также эффектов их действия. Первоначально используемые с этой целью красители были заменены более информативными органическими флуорофорами. Однако выявляемые недостатки использования флуоресцентных органических красителей привлекли внимание к возможности эксплуатации явления флуоресценции, проявляемой нанокристаллами, специально полученными по типу полупроводников из нескольких сотен атомов элементов, составляющих II—VI или III—V группы элементов периодической системы, и покрытых изоляционным слоем, изготовленным из другого инертного материала [1, 31]. Такие нанокристаллы получили название квантовых точек — *quantum dots* — QD. Согласно законам квантовой механики при попадании фотона видимого света на такой кристалл световая энергия первоначально сосредотачивается лишь в сердцевине данной наноструктуры, затем испускается в виде необычно яркой флуоресценции, не подверженной выцветанию со временем. Хотя поглощение энергии происходит на основе самых различных длин волн, характерных для дневного света, испускается лишь сугубо монохроматический свет, который и обеспечивает ту или иную окраску флуоресценции места нахождения кристалла. Эта окраска зависит от размера используемых квантовых точек. Более крупные испускают красный свет, в то время как мелкие структуры светят в голубой области спектра. Наиболее часто использующиеся квантовые точки состоят из таких металлов, как кадмий и цинк, но поскольку эти структуры покрываются биологически инертным материалом (различными

полимерами), проблема их токсичности может быть снята. Аналогично возможности функционализации поверхности самых разных наночастиц поверхность квантовых точек также может быть функционализирована и возможно образование конъюгатов с различными лекарствами, а также с молекулами белков, нуклеиновых кислот и даже с целыми клетками. Следовательно, квантовые точки могут использоваться даже как специальные наносенсоры. Основное требование к их использованию — их водорастворимость. Этого можно достичь с помощью различных приемов, но наиболее широко распространен метод их инкапсулирования в кополимерные блоки [34—37].

Несмотря на то что квантовые точки как средства визуализации клеток обладают рядом преимуществ, связанных с яркой и длительной флуоресценцией, неизменностью их размеров, что для других частиц возможно за счет разбухания в биологических средах, выраженной инертностью неспецифических взаимодействий, имеется и ряд недостатков. Оказалось, что в зависимости от каких-то, пока ускользающих условий, эти точки могут то светить, то нет, иными словами начинают «мигать» [33]. Иногда происходит агломерация этих частиц при их применении на уровне организма, что приводит к соответствующим исследованиям в ранг артефактов. Более того, существует опасность введения в организм структур на основе такого ядовитого тяжелого металла, как кадмий, но возможность внутриорганизменного повреждения этих частиц обусловит их токсичность, хотя организм и снабжен средствами защиты от тяжелых металлов в виде специальных белков — металлотионеинов. В связи с этим внимание привлекают такие частицы, как наночастицы на основе коллоидных растворов золота и частиц, проявляющих магнитные свойства.

Оказалось, что возможно образование коллоидных растворов из золота, представленного в виде специальных наночастиц. Их поверхность может быть функционализирована, например с помощью тиоловых групп, к которым могут прикрепляться молекулы, например ДНК. С помощью такого зонда можно осуществлять поиск гибридизующихся последовательностей при решении тех или иных задач [38, 39]. При этом комплементарные нити ДНК, располагающиеся на различных наночастицах золота, своим взаимосвязыванием укрупняют эти структуры вплоть до видимых образований [37]. Ясно, что с помощью наночастиц из золота можно решать такие же задачи, как и с помощью квантовых точек, однако в этом случае для их выявления необходим не флуорес-

центный, а сканирующий или трансмиссионный электронный микроскоп. Большое внимание к использованию золотых наночастиц привлекла работа, авторы которой установили, что если на этих частицах закрепить соответствующий краситель и фрагменты антител, так называемые пептиды ScFv, узнающие злокачественные клетки, ввести их в мышь и осветить ее лучами лазера, то самый яркий сигнал окрашивания дают лишь клетки опухоли [40]. Такое направление работ открывает путь к разработке методов наиболее ранней диагностики рака.

В области изучения наноматериалов внимание привлекли соединения, обладающие магнитными свойствами. Оказалось, что некоторые микроорганизмы содержат ферромагнитные материалы, благодаря которым в условиях магнитного поля возникает специальная ориентация таких клеток. Этот факт послужил толчком к развитию технологий по обнаружению эффектов связывания субстратов исследуемых биологических материалов используемыми магнитными наночастицами [33]. Только связавшиеся субстраты, в отличие от несвязавшихся, обеспечат возникновение соответствующего сигнала магнетизма. Это может быть выявлено с помощью «микроскопа», представленного специальным прибором SQUID. Он основан на явлении квантовой интерференции высокотемпературного перехода суперпроводимости. Если суспензию магнитных наночастиц, конъюгированных с соответствующими антителами, поместить в лунки панели биологических образцов, исследуемых на предмет содержания выявляемой этими антителами мишени, подсоединить SQUID и создать в пленке импульс магнитного поля на протяжении 1 с, то при выключении магнитного поля сигнал будут давать лишь медленно релаксирующие частицы, связавшие мишень. Наночастицы, не связавшие мишень, быстро утратят свою ориентацию за счет броуновского движения и будут невидимы [1]. В настоящее время эта технология продолжает усовершенствоваться, как и технология использования коллоидных растворов оксида железа. Исключительно малый размер этих частиц, покрытых тем или иным суфферктантом с теми или иными лигандами, позволяет рассматривать их не как суспензию, а как истинный раствор, что облегчает их применение в медицине при использовании образцов в виде разных жидкостей организма и разных тканей [1].

Итак, успех в разработке материалов и приготовлении из них соответствующих наночастиц (отметим, что простым способом при их приготовлении оказалось использование микроволновых

печей [41]) определил необходимость развития технологий по использованию этих структур в качестве средств доставки различных фармакологических агентов только в соответствующие места в организме при выявлении патологий. Ясно, что таким структурам должна быть придана черта селективного узнавания клеток организма. Этого можно достичь, изменяя поверхность таких клеток, так как различные лиганды, связанные с той или иной функциональной активностью, могут быть закреплены на поверхности таких структур. Процедура такого закрепления называется функционализацией, или дериватизацией, наноструктур. Вот эти лиганды и могут определить на основе молекулярного средства лигандов к компонентам тех или иных клеток векторность их попадания в организме в одни клетки и безразличие по отношению к другим клеткам. Ясно, что доставленные таким образом лекарства менее подвержены атаке со стороны организма, отражающейся на его активности, при таком способе доставки снимается проблема его возможного распределения по организму и токсичности для здоровых тканей, а также становится возможным эффективное повышение концентрации лекарства в клетке.

Более того, эффективность векторной доставки лекарства в организме может быть установлена непосредственно с помощью визуализации используемых наноструктур. Однако использование возможности визуализации биологического материала на уровне клеток позволяет не только изучать векторный потенциал той или иной наноструктуры, но и выявлять в клетке молекулы, служащие маркерами тех или иных патологий. Отсюда открываются реальные перспективы для ранней диагностики опасных заболеваний. Возможно применение самых разных способов выявления таких маркеров. В качестве примера приведем результаты работы [42]. Было известно, что при раке, атеросклерозе и некоторых других заболеваниях в соответствующих клетках активизируется экспрессия специальных протеаз и протеазная активность таких клеток увеличивается. Следовательно, если еще при отсутствии наблюдаемых признаков заболевания выявить в клетке такую активность, то ранний диагноз патологии становится возможным. Чтобы сделать это, пошли по такому пути. Оказалось, что если к квантовой точке привязать частицу коллоидного золота, то первая перестает светить. В качестве привязки используется, например, коллаген либо какой-то другой белок или пептид, легко перевариваемый протеазой. Если такой фермент в клетке появился и переварил привязку, то квантовая точка освободится от своего

тормоза и вновь зажжется. Следовательно, с помощью такой специализации может быть поставлен ранний диагноз.

Еще один способ определения отличий между клетками на ранних стадиях развития патологий связан с выявлением различий между жесткостью нормальной и злокачественной клетки. Если здоровая клетка — это мягкое образование, то раковая клетка становится очень жесткой. Как определить этот показатель? По эффективности вхождения вируса, поражающего такие ткани. Для этого из вирусных частиц удаляется ДНК, вносятся визуализирующие наночастицы, узнающие тот или иной маркер злокачественности, и по эффективности свечения в контрольном и опытном образцах можно определить состояние жесткости изучаемых клеток [43].

В настоящее время большое внимание привлекает использование функционализированных наночастиц в качестве биосенсоров появления в клетке тех или иных молекул или их различных состояний. Приведем примеры этого направления исследований. Если на С-трубках закрепить моноклональные антитела к рецептору инсулинового фактора роста, который особенно интенсивно экспрессируется на поверхности раковой клетки, прибавить к ним каплю крови, которая может содержать слущенные клетки возникающей опухоли, и поместить такие трубки между электродами, то при положительном результате искомых взаимодействий величина электрического тока резко увеличится [44]. Также при использовании С-трубок с намотанной на них с помощью гибридизации одностречевой ДНК становится возможным выявление в клетках одностречевых участков в геноме, что может быть обнаружено по возникновению сдвига флуоресценции в ближнем ультрафиолете [45].

Ясно, что области использования наночастиц в практических целях расширяются, и еще одним примером этого является то, что применение наночастиц при ультразвуковом исследовании резко увеличивает контраст снимаемого изображения и облегчает необходимые исследования [46].

Внедрение наночастиц в повседневную жизнь человека ставит в центр внимания проблему их безопасности. На этом пути интерес представляют результаты по обнаружению приемов, с помощью которых Природа может контролировать распространение этих частиц. Так, в шахтах Висконсина в США обнаружены бактерии, которые выделяют какие-то специальные белки, способные поглощать наночастицы, образующиеся на основе таких

металлов, как As, Pb, U, Pt. Среди горных пород обнаружены видимые минеральные образования, напоминающие поперечные срезы древесных пород, в которых годовые кольца представлены чередованиями слоев из неорганических веществ и молекул белков [47]. Вызывает интерес возможность предназначения на эту роль вырезающихся из молекул белков в явлении белкового сплайсинга внутренних частей — интеинов (см. главу 4). Обнаружение такого факта показало бы, что в Природе ничего не пропадает зря, и усилило бы биологическое значение необходимости белкового сплайсинга, а также то, что возможность защиты от наночастиц за счет природных ресурсов может оказаться достаточно распространенным.

Итак, нанотехнологии оказались выигрышным средством доставки лекарства в нужное время в нужное место. Возник вопрос об эффективности отыскания в клетке мишени действия доставленного таким образом лекарства, иными словами, способны ли наноносители лекарств отражаться на характере взаимодействия мишени и лекарства. Первая попытка изучения этого вопроса представлена в работе [48].

В этой работе были сконструированы биodeградируемые полимерные наноносители, снабженные лигандами, которые избирательно узнавали обогащение соответствующими рецепторами только раковых клеток организма. Более того, на основе этих носителей были получены их конъюгаты с малыми молекулами химического ингибитора, выключающего хорошо изученный МАРК-путь передачи сигнала, от активности которого зависит экспрессия генов жизнеобеспечения клетки. Известно, что если в результате действия этого ингибитора фосфорилирование киназы ERK этого пути становится невозможным, то включается механизм программированной смерти клетки — апоптоз. Он еще более усиливается при одновременном использовании цисплатина в режиме обычной химиотерапии. Таким образом, возможность адресной доставки с помощью наноносителей лекарств, представленных ингибиторами молекулярных мишеней, привлекает внимание как перспективная технология, способная стать обычной практикой эффективной медицины.

Облегчает ли прогресс в области возможности сосредоточения лекарства лишь в нужном месте организма усилия по преодолению лекарственной устойчивости? Однозначный ответ на этот вопрос пока не получен и этой проблеме посвящен обзор [49].

Рассмотрев механизмы устойчивости раковой клетки, связанные с активацией различных белковых экспортеров из клетки многих лекарств как субстратов, с исключением апоптотической программы клетки, с последствиями влияния микроокружения опухоли, обусловленными возникающей гипоксией клеток и изменением роли экстрацеллюлярного матрикса, авторы подводят итог результатов первой волны в разработке и использовании наносредств в медицине. Кратко характеризуя этот итог, отметим, что успешно решены многие задачи разных этапов развития нанотехнологий. Однако получение высокозначимых медицинских результатов оставляло желать лучшего. В связи с поиском наиболее эффективных средств доставки и достижения искомых медицинских эффектов особое внимание привлекли рН-чувствительные наносистемы. Охарактеризуем их подробнее.

Если рН цитозоля клетки составляет порядка 7, то в таком компартменте клетки, как эндосома, он, закисляемый с помощью работы протонного насоса — V-АТФазы, снижается до 5—6. Таким образом, важно использовать эндосомный путь введения наночастицы в клетку. Это можно осуществлять с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза или спонтанного эндоцитоза (а также эндоцитоза на основе СРР-пептидов). Наличие в лекарственном наночастице рН чувствительного полимера, который способен к протонированию, вызовет эффект «протонной губки», или усиленного вхождения в эндосому H^+ -ионов (а также ионов Cl^-). При этом в эндосому начинает поступать вода, вызывая разбухание органеллы вплоть до ее разрыва. Так, в результате ликвидации эндосомного компартмента и деградации наночастицы лекарство попадает в цитозоль.

Использование этого принципа позволило сконструировать наночастицы на основе способного к ионизации поли-*L*-гистидина и неионизирующегося полимера поли-*L*-молочной кислоты, конъюгированной с фолиевой кислотой. Она позволяет избирательно взаимодействовать с клетками, наиболее интенсивно экспрессирующими рецептор этой кислоты, а такими клетками являются злокачественные клетки. Более того, использование в качестве мишень-наводящего лиганда такого проникающего в клетки пептида, как Tat-пептид позволило получить конструкцию, которая при испытании *in vitro* снижала IC_{50} применяемого лекарства, доставленного в клетку с помощью этой конструкции по сравнению с циркулирующей лекарства в свободном состоянии, от 3—4 до 8 раз. Такой способ доставки терапевтического средства

не бросает вызов работе множественных экспортеров, и лекарство из клеток не выбрасывается. Ясно, что эта конструкция представляет большой интерес для исследований *in vivo* [49].

Наибольший интерес в настоящее время привлекла наноконструкция, принцип действия которой позволил присвоить ей по имитации образа и подобия вирусной частицы название «виругель» (*virugel*) [49]. Этот принцип показан на рис. 10.2 (см. вклейку).

Конструкция состоит из двух частей: липофильной сердцевины — кора и гидрофильной оболочки. Первая представлена полимером поли-L-гистидином-ко-фенилаланином. Вторая — ПЭГ и бычьим сывороточным альбумином (БСА). Один конец ПЭГ связывается с коровым полимером, другой — с БСА, который образует как бы вирусный капсид. Оказалось, что такая конструкция обладает способностью разбухать и сжиматься в зависимости от рН. Если такую конструкцию заполнить, например, доксорубицином, то при попадании этой конструкции в эндосомальные условия она набухает, и лекарство выскальзывает из нее. Более того, такое резкое увеличение объема наночастицы способно разорвать мембрану эндосомы и наночастицы оказываются в цитозоле в условиях нейтрального рН, моментально сжимаясь до исходных размеров. При смерти и лизисе такой клетки под действием внесенного лекарства исходная наночастица повторит цикл превращений и действий, уничтожая подобно действию вируса все новые и новые клетки. В настоящее время эта наносистема привлекает большое внимание в связи с поиском решения конкретных клинических задач.

Представляет интерес также использование ферромагнитных наночастиц, с помощью которых удавалось снизить уровень устойчивости раковых клеток к онколекарствам. Так, в работе [50] на модели устойчивых клеток лейкемии, привитых подкожно голым мышам, показано, что при введении в такие клетки 5-бромтетрандрина и Fe(3)O(4)-наночастиц, объединенных с даунорубицином, наблюдался резко выраженный противоопухолевый эффект. При этом снижалась экспрессия антиапоптозного фактора bcl2 и возрастала экспрессия Вах и каспазы 3. В работе [51] установлено, что введение цисплатина в составе ферромагнитных частиц резко повышало чувствительность устойчивых клеток к действию цисплатина, и это может быть связано с наблюдающимся увеличением экспрессии белка bcl2 и survivine.

Итак, идеи и технические возможности современных нанотехнологий охватывают и такую область, как медицина, обеспечивая

в настоящее время получение результатов и теоретического, и практического значения. Основные усилия в разработке нанотехнологий сосредоточены на решении проблемы адресной доставки в организме наночастиц, конъюгированных с тем или иным лекарством, а также на возможности сравнительной визуализации тех или иных структур клетки в случае проявления клеткой фенотипа чувствительности или устойчивости к применяемой химиотерапии. Более того, нанотехнологии позволяют обнаруживать маркерные молекулы, появляющиеся на самых ранних стадиях развития той или иной патологии.

Поскольку функционирование клетки можно рассматривать как координированную совокупность различных систем и их взаимодействий, важно рассмотрение вопроса о возможной связи между Mdr-фенотипом клетки и состоянием ее системного уровня организации. Современные знания о биологии систем суммированы в следующей главе книги.

О СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВ

Как мы уже отмечали, в биологии, как и в каждой науке, выделяются различные периоды накопления знаний на пути установления законов и сущности жизни. Один из самых значительных до настоящего времени периодов характеризуется термином «редукционизм». Суть этого термина означает использование подхода, связанного с разбором целого на части и изучение частей по отдельности. Кульминацией достижений этого периода стали разработка возможности и переход биологических исследований на молекулярный уровень и становление специальной дисциплины — молекулярной биологии. Раскрытие химической природы компонентов клетки, на основе которых протекают биологические процессы, и разработка высоких технологий, позволяющих изучение свойств и поведения молекул в реальном времени и пространстве привели к возникновению замыкаемых в цикл огромных массивов специальных областей молекулярных исследований. Объединение количественных данных этих массивов с помощью разрабатываемых компьютерных программ позволяет сформировать теорию выявляемых биологических свойств, провести их компьютерное моделирование, реконструкцию того или иного биологического процесса и выдвинуть способную к экспериментальной проверке гипотезу, объясняющую суть наблюдаемого явления [1—7]. Эти массивы экспериментальных данных удобно очерчиваются с помощью прибавления к названию каждой области суффикса «омика»: геномика, эпигеномика, интерферомика, транскриптомика, интерактомика, киномика, транслятомика, протеомика, метаболомика, гликомика, липидомика и др. Технологические возможности вычленения таких областей исследования способствовало расширению спектра изучаемых в клетке и организме молекул и их свойств, определяющих протекание биологических процессов. В рамках традиционного редукционистского подхода расширение такого спектра увеличивало вероятность иден-

тификации какого-то отдельного компонента или какого-то одного вида молекул, с поломкой которых связывалось нарушение той или иной функции и возникновение той или иной патологии. Во многих случаях решения медицинских и биологических задач такая идеология давала положительные результаты. Однако при такой патологии, как рак, оказалось, что при поиске первопричины заболевания в виде молекул специального онкогена было обнаружено более 70 онкогенов, и индуцированные поломки в них не приводили к возникновению рака. Это послужило толчком к формированию перехода от логического мышления о системной организации функциональной активности клетки и управлению ею с помощью регуляторной сети взаимодействий к необходимым экспериментальным воплощениям в рамках этого мышления. Изучение злокачественного роста клеток показало, что в результате нарушений в работе регуляторной сети взаимодействий клетка утрачивает в организме контроль своей активности, обязательный в условиях многоклеточности, и начинает безудержно расти и размножаться, образуя злокачественную опухоль. Следовательно, рак — это заболевание системного уровня, раскрытие принципов организации которого определяет успех в борьбе со злокачественным размножением клеток [8]. Итак, изучение компонентов клетки на молекулярном уровне, установление динамического характера их свойств и полное управление ими с помощью специальных регуляторных клеточных механизмов составили основу возникновения новой биологической дисциплины, получившей название системной биологии. История ее возникновения описана в работе: Alon Uri. An introduction to systems biology: Design principles of biological circuits. — London, UK: Chapman & Hall, 2007. — 301 p. — ISBN 978-1-584-88642-6.

Кратко остановимся на определении понятия система и ее свойствах. Определим систему как некую единую структуру, которую, однако, возможно разобрать на отдельные самостоятельные части, обладающие каждая своими свойствами. Основная особенность таких частей состоит в их способности к взаимодействиям между собой уникальным образом, и это приводит к возникновению нового качества, нового свойства, присущего системе в целом и не характерного ни для одной ее части. Отсюда, система характеризуется таким термином, как возникновение нового свойства — *emergent property*, предсказуемость которого и составляет первостепенную задачу системной биологии. Таким образом, установленное с помощью молекулярной биологии наличие необ-

ходимой для жизни человека генетической информации в количестве приблизительно 25 тыс. генов, дающих начало мириадам белков, функционирующих в различных клетках организма, образуют системы различных уровней сложности. Это наделяет организм свойствами, не всегда напрямую зависящими лишь от генетической детерминации.

Итак, логика живого основывается на принципах, которые должны обеспечивать увеличение степени разнообразия организмов. От этой величины зависит запас прочности жизни за счет возможности формирования великого множества приспособительных реакций живого в борьбе за выживание организма в тех или иных условиях. Можно высказать предположение о том, что системная биология позволяет установить закономерности, отвечающие за вклад чисто генетического и системного уровней организации жизни, а также характера и результата взаимодействий этих уровней в обеспечении фенотипа организма и того, что необходимо как для сохранения устойчивости этого фенотипа, так и осуществления его изменчивости. В решении этих задач системная биология находится еще в младенческом возрасте. Одни задачи поддаются решению более легко, другие — с большим трудом. Так, в настоящее время установлен принцип, на основании которого система может поддерживать состояние своей устойчивости. Терминологически это принцип избыточности (*redundancy*) или возможности выполнения одного и того же дела в виде различных версий работы соответствующих молекулярных средств. Поясним идею этого принципа на одном конкретном примере.

Как известно, молекулы гомологической ДНК способны к слипанию, синапсу на основе комплементарного взаимодействия оснований и взаимному обмену своим материалом. Такая гомологическая рекомбинация — эффективное средство для быстрого достижения генетического разнообразия. Однако оказалось, что геномы организмов содержат большое количество повторяющихся последовательностей, также способных к рекомбинации на основании гомологии оснований. В этом случае рекомбинация называется эктопической [9]. Особенность этого вида рекомбинации заключается в том, что при небольшом вкладе в эффект генетического разнообразия она может приводить к серьезным поломкам в геноме. Следовательно, в природе этот вид рекомбинации должен контролироваться особенно тщательно. Как уже указывалось, эта роль возложена, прежде всего, на специальную архитектуру ядра и хромосомных территорий, ограничивающих подвижность

хромосом и возможность встречи отдельных их участков друг с другом. Но оказалось, что это — не единственное средство. На это же направлена работа эпигенетических механизмов клетки за счет введения метильных групп по 5-му положению цитозина, запрещающих эктопическую рекомбинацию. Более того, квантово-физические расчеты компонентов ДНК, особо интенсивно проводящиеся также в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины, показали возможные существенные различия в состоянии этих компонентов так, что на уровне молекул ДНК возможно существование микрогетерогенностей [10]. Не исключено, что молекулярный аппарат, осуществляющий реакции рекомбинации, чувствует эти микрогетерогенности и не классифицирует данный генетический материал как гомологический. А это позволяет геному, наделенному свойством пластичности, оставаться в молекулярном покое. Таким образом, клетка использует три различные возможности для достижения одного и того же конечного результата, эффективно эксплуатируя принцип избыточности. В настоящее время становится известным, что этот принцип распространен в Природе очень широко.

В связи со становлением системной биологии, раскрытием ее основ, определением предмета и идеологии исследований возникает вопрос о том, не является ли развитая П. Эрлихом концепция «волшебных пуль» («*magic bullets*») [11] как средств, выводящих из строя лишь определенный вид молекул, некоторым упрощением возможности получения конечного результата. Безусловно, эвристическая роль этой концепции велика. Благодаря ей возник специальный термин — «мишень действия ингибитора» и большое количество молекул изучалось как потенциальные мишени действия того или иного лекарства. В результате сложилось специальное направление исследований — оценка способности молекулы быть мишенью, или *target validation*. Однако со становлением и развитием системной биологии становится ясным, что выбор мишени и биологические эффекты ее блокирования определяются ролью этой мишени в формировании функционирования той или иной системы, и возникающих в ней свойств, а также средствами избыточности, поддерживающими устойчивость данной системы. Очевидно, понятие «волшебной пули» перемещается с мишени, представленной одним видом молекул, на мишень, представленную сетью взаимодействий. Изучение закономерностей системного уровня организации живого встало на повестку дня, что особенно важно в связи с возможностью внесения

возмущений в системы за счет природных факторов, таких, например, как однонуклеотидный полиморфизм — SNP, мутагенез или поступление лекарства в клетку.

Прежде всего, отметим, что в системной биологии сложилось два подхода. Один из них связан с изучением минимизированных форм жизни — минимального генома, функционирующего в минимальной клетке, и минимального многоклеточного организма. Другой подход — это изучение организмов с их природной сложностью, однако настолько всестороннее их изучение, насколько позволяют средства междисциплинарных исследований с последующим анализом интегративных данных, используя математическое и компьютерное моделирование. Такая обработка данных позволяет сформировать ту или иную гипотезу относительно сути того или иного явления и возможность экспериментальной проверки данной гипотезы, а также открывает путь к установлению искомой закономерности. Охарактеризуем кратко логику и результаты этих двух подходов.

Что касается возможностей подхода по минимизации форм жизни к изучению закономерностей системной биологии, то в настоящее время наиболее широкие перспективы для получения необходимых результатов открывает сформировавшаяся в последнее время так называемая синтетическая биология. Эта новая дисциплина преследует цель изучения биологических процессов, протекающих на основе не природных молекул, а их подобию, полученных синтетическим путем. Возможность такого воспроизведения процессов позволяет разрабатывать высокие технологии по производству различных ценных продуктов (включая производство топлива), вакцин, эффективных лекарств, биосенсоров, средств для очистки окружающей среды и т. п.

Основным достижением синтетической биологии является получение синтезированного химическим путем генома, главным свойством которого оказалась возможность запуска его работы в природной прокариотической клетке в полной мере. Этапы этой работы представлены в многочисленной литературе, итог же этих исследований подведен таким образом [12].

Ясно, что решение задачи по получению минимального синтетического генома легче всего начинать на основе минимального природного генома, лишив его, прежде всего, всех факторов избыточности. Данные секвенирования геномов самых разных форм жизни показали, что минимальным геномом обладают бактерии, инфицирующие генитальные пути высших эукариот, — микоплаз-

мы. Размер генома одного из их видов составляет $5,8 \cdot 10^5$ п. н., кодирующих 482 гена. Все ли эти гены нужны для поддержания жизни бактерии в идеальных лабораторных условиях существования или какая-то их часть используется лишь для подстраховки активности генома при возникновении форсмажорных обстоятельств? Как это установить? С помощью метода глобального транспозиционного мутагенеза. Если мобильный элемент — транспозон встраивается в каком-то месте генома и такая инсерция прерывает правильную запись в геноме того или иного генетического текста, то продукт гена, закодированного в этом тексте, не образуется. Если же этот продукт необходим для жизни клетки, то без него клетка погибнет, но останется живой в случае поврежденный несущественного (*non-essential*) гена. Таким образом, анализируя число инсерций транспозона, значительно превышающее число генов генома микоплазмы, и секвенируя места стыковки транспозона с последовательностями бактериального генома, удалось установить, без каких генов существование клетки в идеальных условиях возможно. Число таких генов составило 95. Следовательно, необходимо синтезировать молекулу ДНК, содержащую неотъемлемые 387 генов, кодирующие РНК и белки с известной и неизвестной функциями [13].

Однако с целью надежности разработки технологии по установлению формата работ, направленных на создание минимального генома и минимальной клетки вначале для манипуляций был выбран геном такого вида микоплазм, который почти в 2 раза превосходил указанный ранее размер генома другого вида микоплазм. Это давало возможность впервые провести синтез такой огромной молекулы и изучить ее поведение при манипуляциях. Идентификация несущественных генов позволяет перейти к следующему этапу манипуляций с такой молекулой — усекованию ненужного для данных условий существования. Стратегия синтеза такой огромной молекулы ДНК состояла в следующем. Прежде всего, выбранный геном был разбит на 1078 различных кассет ДНК размером 1080 п. н., каждая из которых была синтезирована машинным образом согласно известному коду так, что концы каждой кассеты перекрывались со своими соседями на 80 п. н. Следующий этап состоял в соединении этих кассет. Это возможно на основе клеток дрожжей. Оказалось, что при хаотичном введении в них различных фрагментов гетерологической ДНК становится возможным такое их объединение, что полностью идет восстановление всего биохимического пути (*pathway*) для синтеза

того или иного продукта. Таким образом, возможность объединения хаотично введенных фрагментов ДНК в соответствующем для этого биохимического пути правильном порядке расположения генов можно рассматривать как создание искусственной хромосомы YAC — *yeast artificial chromosome*. (Введение в такую хромосому областей генома дрожжей, ответственных как за автономную репликацию ARS — *autonomous replication sequences*, так и за функцию центромеры, обеспечит воспроизведение такой хромосомы в клетках и ее правильное распределение между ними при их размножении [14]. Наличие в такой хромосоме высокоактивных промоторов дрожжей обеспечит высокую эффективность экспрессии введенных гетерологичных генов. ДНК YAC может быть легко обнаружена не только с помощью гибридизации, но даже как результат ее специального положения в геле при электрофорезе.)

Используя дрожжевую систему сборки фрагментов ДНК, синтетический геном микоплазмы был собран в три этапа. На первом этапе в клетки дрожжей с помощью электропорации вводили одновременно по 10 первоначальных кассет размером 1080 п. н. Таким способом было получено 110 вторичных кассет размером 10 тыс. п. н. На втором этапе введения в дрожжи опять одновременно 10 кассет этого типа было получено 11 третичных кассет размером 100 тыс. п. н. Наконец на третьем этапе из 11 кусков ДНК размером 100 тыс. п. н. был собран полный синтетический геном микоплазмы. (Следует отметить, что для получения крупных образований из кусков ДНК внимание также привлекает высокоактивная система рекомбинации, обнаруженная в клетках такого полиэкстремофила, как бактерии *Deinococcus radiodurans*. Рекордная устойчивость этих клеток к радиооблучению связана с тем, что их ДНК, превратившись в результате мощного облучения практически в мелкие щепки, в течение некоторого времени после облучения способна восстановить исходное состояние, рекомбинируя куски ДНК друг с другом и обеспечивая облученной клетке жизнеспособность.)

Следующий шаг на пути установления формата по получению минимальной клетки состоял во введении синтетического генома также в клетки микоплазмы и запуске работы в них введенного в клетки генетического материала. Для этого также использовали высокоэффективный метод электропорации клеток, резко увеличивающей их пропускную способность для введения макромолекул. Для того чтобы хозяйский геном не отторгал введенный син-

тетический геном за счет разрубания ДНК с помощью присущей бактериям системы рестрикции, гены, кодирующие рестрикционные ферменты в геноме хозяина, были инактивированы. Такие же функционально активные гены, принадлежащие синтетическому геному, разрубали геном клетки-реципиента, оставляя в клетке лишь только введенный синтетический геном. При делении такой клетки в ряду поколений возникает клетка, все содержимое которой обусловлено только генетической информацией, считываемой на основании синтетического генома. Итак, подход к созданию минимального генома и минимальной клетки создан.

Поскольку первые испытания функциональной активности синтетического генома не дали ожидаемых положительных результатов, был разработан метод испытания пригодности полученных 11 кассет синтезированного материала по частям. Для этого использовали комбинацию 100 тыс. п. н. фрагментов природного и синтетического происхождения, образующую полусинтетический геном. Заменяя в природном геноме те или иные 100 тыс. п. н. полученной синтетической кассетой, изучали способность клетки оставаться живой. Это наблюдалось при испытании первых 10 кассет, в случае же 11-й кассеты клетки оказались нежизнеспособными. Сравнение природной и синтетической последовательности этого региона выявило в синтетической кассете делецию одной пары оснований в обязательном (*essential*) гене и исправление этой ошибки привело к положительному конечному результату.

Отметим, что, впервые выполнив работу по синтезу такой огромной молекулы ДНК, как целый геном одноклеточного организма, авторы снабдили его опознавательными знаками (они назвали их водяными знаками). В качестве таковых в синтетический геном вводили специальные последовательности, которые в соответствии с придуманным шифровальным кодом отвечают буквам алфавита и цифрам. Согласно такому коду, в этих последовательностях можно прочесть три цитаты: 1) «жить, ошибаться, падать и подниматься, создавать жизнь из жизни» (Джеймс Джойс); 2) рассматривайте вещи, не какими они есть, а какими они могли бы быть и 3) цитата из книги «Американский Прометей»: «То, что я не могу построить, то я и не могу понять» (Ричард Фейман). Такие знаки являются не только документом синтетического генома, но и позволяют следить за его поведением в зависимости от условий и времени функционирования.

Итак, возможность создания биологически активного искусственно синтезированного генома и манипуляций с любой его частью открывает самые широкие перспективы не только в развитии биотехнологии, но и в системной биологии. Такая мощная разработанная технология позволяет устанавливать функцию каждого существенного гена, роль, выполняемую в клетке несущественными генами, и, пользуясь природной и минимальной версиями генома, легче перейти к изучению возникающих свойств на системном уровне организации клетки и закономерностей при образовании той или иной системы. Более того, обнаружение влияния на жизнеспособность клетки пропуска лишь одной пары оснований в миллионном геноме ставит вопрос о роли тех или иных мутаций в функционировании систем клетки.

Что касается второго подхода, основанного на получении данных всестороннего изучения таких сложных систем, как многоклеточные организмы, то привлекательна также идея использования принципа минимальности. Этому критерию отвечает такой организм, как трипаносома — паразит, вызывающий в Африке сонную болезнь. Особенность этого организма заключается в том, что его существование возможно в виде как одноклеточной, так и многоклеточной форм. (Следующим по простоте и доступности для исследований является микроскопический червь нематода с достаточно небольшим известным числом генов секвенированного генома и известным числом клеток с известной по мере их возникновения локализацией в организме.)

Поскольку путь развития системной биологии связан с созданием компьютерных моделей, составляющих «силиконовую клетку», представляло интерес построение основанных на взаимодействиях и кинетических свойствах метаболических моделей трипаносомы. Такие модели позволяют выявить молекулы, наиболее пригодные в качестве мишени действия того или иного лекарства. Это отменяет необходимость использования дорогого и длительного метода проб и ошибок, во всяком случае, на I и II фазах фармакологических испытаний. Для компьютерного построения метаболических моделей для клеток трипаносом был выбран путь гликолиза в этих клетках. Для сдерживания размножения трипаносом в организме хозяина в качестве лекарства применяли в основном ингибитор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, но модель показала, что наибольший эффект для функционирования гликолитического пути связан с активностью переносчика глюкозы. Более того, построение компьютерной модели протекания ме-

таболического процесса позволило выявить роль такой необычной органеллы клеток трипаносом, как гликосома, объединяющая ферменты гликолиза в эту специальную структуру. Оказалось, что при нарушении мембраны гликосомы метаболизм клетки изменяется так, что из глюкозы не образуется, как обычно, пируват, который выводится из органеллы. Вместо этого образуется фруктозо-1,6-бифосфат, который не выводится из этой органеллы и накапливается в таких больших количествах, что приводит к разрыву органеллы и клетки [15]. Таким образом, построение компьютерной метаболической модели открывает непредвиденный в эксперименте путь поиска самых эффективных мишеней того или иного воздействия, сути того или иного явления и формирования той или иной гипотезы, которая может быть проверена экспериментально.

Итак, системная биология — это не только новый подход для идентификации соответствующих мишеней лекарственного действия, но и изучение поведения этой мишени в конкретном биологическом контексте, определяющем различия ответа пациентов на лекарства, зависящего не только от генотипа, но и от различий в возникающем фенотипе. Следовательно, в рамках системной биологии возникает необходимость идентификации конкретных физиологических маркеров (например, уровня содержания холестерина в крови) или каких-то их групп, которые дают возможность определить состояние той или иной системы взаимодействий в клетке. Идеология системной биологии позволяет изменить подходы к разработке лекарств, основывающиеся на возможности замены метода проб и ошибок (обуславливающего до 75 % отхода на стадии предклинических испытаний и их фаз I и II) на более тонкие методы математического моделирования эффективности действия лекарства и его токсичности.

Помимо новых возможностей в развитии фармакологии системная биология поднимает вопрос о связи между свойствами, поведением систем клетки и возникновением хемотройчивости. В качестве примера системного подхода к изучению биологических явлений, в частности хемотройчивости, остановимся на классической работе [16].

Идея ее состояла в том, чтобы изучить, как фенотипически ведут себя различные 104 сегреганта от кросса двух штаммов дрожжей с известными генетическими различиями в оптимальных условиях функционирования и при действии того или иного лекарства. Клетка дрожжей — оптимальный объект для такого ис-

следования, с числом генов, составляющих ее геном порядка 6 тыс., характер экспрессии которых может быть надежно установлен в эксперименте с помощью технологии микроэррей. В качестве связующего звена между генотипом и проявлением соответствующего фенотипа в случае дрожжей предоставляется возможность экспериментального изучения скорости роста клеток и накопления клеточной массы за один и тот же промежуток времени в оптимальных условиях роста и при действии того или иного лекарства. Идентификация генетических различий между двумя выбранными штаммами дрожжей позволила использовать 526 маркеров для изучения связи между возможными изменениями в генотипе клеток и возникновением того или иного фенотипа. Оказалось, что возможность изучения маркеров генотипа и профиля экспрессии 6189 генов дрожжевого генома позволяет разделить изучаемый геном как бы на две группы генов, от состояния которых не зависит возникновение того или иного фенотипа либо явно зависит. Эти последние можно рассматривать как причинные гены (*causal genes*). Применение математического аппарата к обработке полученных данных изучения 104 сегрегантов позволило создать специальный алгоритм анализа, получивший название Camelot (*Causal Modelling with Expression Linkage for cOmplex Traits*). Camelot объединяет в единое целое данные изучения генотипа клеток, профиля экспрессии всех генов и результирующего клеточного фенотипа. Это дает возможность построить автоматическую модель, с помощью которой можно предсказать количественные фенотипические признаки и выявить гены, важные для проявления этих признаков, или причинные гены. Такая модель, построенная на основании полученных в контрольных условиях данных, позволяет предсказывать, как то или иное изменение (например, действие на клетку 94 различных лекарств) отразится на геном и какие он предпримет шаги для нивелирования влияния этих условий на функционирование клетки и ее жизнеспособность. Правильность предсказаний модели, построенной с помощью Camelot, была проверена экспериментальным путем, и предсказание оказалось правильным для 25 из 27 различных изученных лекарств. В результате этого исследования было обнаружено 14 новых генов, от состояния которых зависит устойчивость или чувствительность клетки к тому или иному лекарству. Интересно, что среди этих генов оказался такой, который необходим для функционирования митохондрий в клетке. Таким образом, возможность раскрытия механизмов проявления клеткой

того или иного функционального поведения позволяет направленно обнаруживать более эффективные мишени фармакологического действия. Учитывая, что разработка нового лекарства связана с большим потреблением денежных средств (расход американских компаний составил в 2006 г. 55,2 млрд дол., с вложением 1,2 млрд только в разработку одного лекарства), развитию системной биологии придается большое значение как революционной технологии в фармакологии [17]. Ясно, что результаты, полученные в работе [16], представляют клинический интерес в связи с возможностью предсказания, какое лекарство, ранее не принимаемое пациентом, будет более эффективным, учитывая его генотип и профиль экспрессии генов.

Системно-биологический подход использован в работе [18], преследующей цель выяснения определяющих фенотип различий между чувствительной и устойчивой к цисплатину раковыми клетками. Хотя известно, что в устойчивой клетке обнаруживается множество различий по сравнению с чувствительной клеткой, детали механизма возникающей резистентности к цисплатину остаются неизвестными. Авторы провели сравнение протеома чувствительной и устойчивой клеток, что позволяет определить уровень глобальных белков, а также изменений в характере их взаимодействий в клетке. С помощью масс-спектропии обнаружено, что содержание 119 белков резко различается у этих типов клеток. В устойчивой клетке эти белки образуют соответствующую сеть с участием 1230 белков, в которой обнаруживается 111 взаимодействий между компонентами сети. Оказалось, что участниками этой сети являются такие белки, как АТФаза, переносящая протон, комплекс АТФсинтазы, белоксвязывающие белки. При определении взаимодействий между отдельными белками сети с помощью компьютерного моделирования вырисовывалось, что физиологический ответ клетки связан с активностью сигналов, возникающих при стрессе клетки. Это коррелирует с известным действием цисплатина, вызывающим поломки в ДНК. Более того, изучение характера взаимодействий в отдельных частях цепи позволяет различать в сети узлы взаимодействий и периферические компоненты взаимодействий. Такие данные позволяют ставить новые вопросы и открывают новые перспективы в экспериментальном изучении механизмов хемотрезистентности.

Ярким примером возможностей нового системного подхода к изучению биологических явлений являются полученные в лаборатории N. Chandra результаты исследований по туберкулезу, свя-

занные с метаболизмом в клетках туберкулезной палочки, обнаружением в них перспективных мишеней действия цитостатиков, возникновением устойчивости к ним, а также характером взаимодействий по линии хозяин—патоген [19, 20]. Кратко опишем эти результаты.

Прежде всего, используя математический анализ баланса метаболических потоков в биохимических сетях всего организма (*flux balance analysis* — FBA), была создана полная модель пути синтеза муколиевой кислоты — MAP, которая определяет патогенность туберкулезной палочки и защищает ее от действия фагоцитов. Этот путь включает 197 метаболитов, являющихся продуктами 219 реакций, которые осуществляются с помощью 28 ферментов. FBA и метод делеций генов этого пути, как и ингибирование соответствующих белков с помощью малых молекул показали, какие из этих ферментов более критичны на пути синтеза муколата. Так в поле зрения исследователей попали наиболее перспективные мишени, и использованный подход системной биологии оказался более рентабельным при поиске мишеней по сравнению с обычно применяемым методом мутагенеза с помощью транспозонов.

Более того, в этой лаборатории было проведено сравнение геномных последовательностей различных видов бактерий, отвечающих за синтез муколиевой кислоты. (В настоящее время секвенировано 318 различных бактериальных геномов.) Изученные виды бактерий были сгруппированы по признаку встречаемости звеньев синтеза MAP в их протеоме, а белки этого пути синтеза были сгруппированы по признаку их эволюционной шкалы времени. Так удалось показать, что четыре фермента этого пути синтеза, а также некоторые домены этих белков присущи только тем видам бактерий, которые образуют муколлат. Ясно, что эти молекулы привлекают внимание в первую очередь как перспективные мишени при разработке антитуберкулезных лекарств. Проведенный анализ геномных и протеомных последовательностей большого числа видов показал, что MAP может быть классифицирована как *emergent property* сети биохимических реакций. Эта сеть образовалась, очевидно, в результате латерального захвата бактериальной клеткой соответствующих генов растительной клетки. Возможность синтеза такой молекулы, как муколиевая кислота обеспечила надежность существования микроба.

Также информативно сравнение метаболических путей разных видов микобактерий. Возможность построения разных видов био-

химических сетей — транскрипционной, метаболической, белково-белковых взаимодействий — позволила разработать теорию графического спектра представления реакций (*spectral graph theory*). Возможность построения таких графиков метаболизма для *M. tuberculosis* и *M. leprae* позволила выявить существующие различия на метаболическом уровне, отражающем корреляцию между активностью гена и соответствующими продуктами этой активности в клетке. Более того, теория спектра графического представления метаболизма дает возможность выявлять в клетках бактерий различия и на системном уровне как метаболических реакций, связанных не только с активностью генов. Такая возможность также сужает поиск наиболее перспективных мишеней для разработки эффективных лекарств. Более того, идентификация образующих при графическом представлении центров сгущений и разных подгрупп метаболических реакций в клетке микобактерий и кишечной палочки позволила установить, что центральным субстратом запуска метаболизма в туберкулезной палочке является глутамат, в то время как для кишечной палочки — это пируват. Такое сравнение метаболических путей дает возможность увидеть те из них, которые особо важны для жизнеспособности клетки.

Системный подход к изучению биологического явления позволяет также получить информацию относительно механизма возникновения устойчивости к действию того или иного цитостатика. С этой целью была построена модель белково-белковых взаимодействий на уровне всего протеома с выделением белков как узлов взаимодействий и таких взаимодействий, которые можно рассматривать как краевые (*edge*), или периферические, в сети. При проведении анализа учитывали весь набор известных генов, определяющих фенотип резистентности. Анализ белков клетки на системном уровне позволяет увидеть маршрут метаболических реакций, приводящих к возникновению лекарственной резистентности. С помощью компьютерных программ и построения модели глобальных взаимодействий удалось выяснить, что та или иная мишень обладает склонностью к запуску того или иного из четырех основных механизмов хемотрезистентности. Идентификация в этой модели самых коротких путей взаимодействий между мишенью и набором генов устойчивости дает возможность выделить подсистему, определяющую механизм возникновения резистентности. Обнаружение самых коротких путей взаимодействий позволяет проверить экспериментальным путем с помощью технологии микроэреж возможность сверхэкспрессии соответствующего

гена хеморезистентности и то, насколько центральным в интерактоме является данное взаимодействие. Частота встречаемости таких путей взаимодействий и их метаболическая организация способны указать на то, какой механизм устойчивости должен возникнуть. Из этих данных становится ясным, что для успешного поддержания чувствительности клетки к применяемому лекарству необходимо подавить не только соответствующую мишень, но и комишень (или комишени), входящие в данную подсистему, от которой зависит фенотип химиорезистентности. Также очевидно, что разработка наиболее эффективного лекарства связана с выбором не только оптимальной мишени действия, но и соответствующих ко-мишеней.

Итак, в лаборатории Chandra разработали алгоритм связывания в единое целое данных взаимодействий в интерактоме, баланса метаболических потоков в реактоме, геномных последовательностей, фенотипических особенностей, а также структурных особенностей мишеней. Такой подход позволил выявить наиболее перспективные мишени, подавление которых безопасно для организма хозяина и его природной микрофлоры.

Если в настоящее время лечение туберкулеза связано с применением, в основном, средств, разрушающих синтез муколята, то в лаборатории Chandra преследуют цель разрушения метаболизма туберкулезной палочки в целом. Для этого проводится анализ сети реактомы, охватывающей метаболизм микробной клетки, и, таким образом, могут быть установлены зависимости как между готовыми отдельными белками, так и между продуктами цепи их синтеза в клетке. Эти зависимости могут проявляться и при отдаленном, и при очень близком взаимодействии. Ясно, что инактивация ближних взаимодействий наиболее сильно нарушит ход метаболизма клетки, а также ее жизнеспособность и, следовательно, эффективными окажутся лекарства, одновременно препятствующие от одного до четырех различным ближним взаимодействиям и их различным комбинациям.

Протекание инфекционного заболевания зависит от характера взаимодействия между иммунной системой хозяина и патогеном. Системный подход к изучению этого взаимодействия позволяет построить модель, учитывая и характеризуя различные компоненты хозяина и микробной клетки, различия в состоянии клеток и процессов, в них протекающих. Более того, построенная модель, включающая 75 белковых узлов, учитывала эффекты вакцинации, явления бактериального очищения (*bacterial clearance*) организма и

возможных скоростей роста клеток. Использование виртуального приема делетирования тех или иных факторов системы, как и внесение факторов возмущений системы, показали, что нарушение фагоцитоза, слияния фаголизосомы и цитокины, такие, как TNF и IFN, ухудшают бактериальное очищение, в то время как удаление цитокинов, например IL-10, а также бактериального защитного белка SapM резко его улучшают. Модель позволяет предсказать, как и от каких условий существования зависит характер протекания инфекции, и отсюда становятся возможными рекомендации, полезные для клинического применения.

Итак, становление в биологии мышления, направленного на разработку новых подходов к экспериментальным исследованиям, связано с изменением такого традиционного экспериментального подхода, как разбор целого на части и изучение частей по отдельности. Доминирующим становится рассмотрение во всей совокупности полученных многочисленных данных изученного с разных сторон явления, что ведет к возникновению в клетке свойств, детерминированных не только генетически, но и благодаря системной организации взаимодействий между отдельными структурами клетки. В результате такого взаимодействия возникают свойства клетки, зависящие не непосредственно от генетического кода, но и от законов, управляющих построением той или иной системы и ее функционированием. Такие свойства важны, так как они наряду с генетическими признаками определяют фенотип клетки. Следовательно, необходимо раскрыть принцип формирования систем жизнеобеспечения клетки и основ, определяющих возникновение того или иного свойства, проявляемого только целостной системой, а не ее отдельными частями. Системная биология разработала такой подход анализа к изучению биологических явлений, который основан на возможности количественных описаний сложных биологических признаков с применением математического аппарата и компьютерного моделирования, манипулируя результатами, добытыми методами различных «омик». Важным достижением на этом пути стало описанное выше создание минимальной клетки и минимального генома как самого простого объекта изучения законов системного уровня организации в биологии. Первые результаты такого изучения уже получены: делеция в геноме лишь одной пары оснований в соответствующем гене оказалась летальной. Следовательно, соответствующая структура либо не входит в систему, либо не подчиняется закону избыточности и не имеет обходных путей в сети метаболизма (*metabolic*

bypass). Почему? Как поведут себя другие структуры? Приведет ли делеция этой пары оснований в гене к летальности в случае природной клетки или при полном наборе генов, данных Природой, возможна защита клетки. Ясно, что начало исследований с использованием минимальной клетки и генома положено.

Что касается изучения механизмов хемоустойчивости на системном уровне организации природных клеток про- и эукариот, то в настоящее время используется возможность построения на основании базы данных метаболических реакций клетки сети взаимодействий с выявлением в ней узлов, или вершин (*vertices*), и краев (*edges*) этих взаимодействий. Такая сеть может быть описана с помощью специального математического аппарата, называемого *spectral graph theory*. Важно то, что с помощью этого приема может быть охарактеризован математический показатель, называемый *k-shortest path algorithm*. Оказалось, что этот показатель в случае чувствительных и устойчивых клеток различен. Изучение с помощью техники микроэрреев профиля активности генов в обоих случаях позволяет определять, от каких генов зависит это различие. Это облегчает раскрытие механизма возникающей хемоустойчивости и поиск пути преодоления этого явления. Плодотворность такого подхода показана при изучении механизмов лекарственной устойчивости в случае туберкулеза [20], рака яичников и легких [21].

Особый интерес представляет системная биология в связи с поиском ответа на вопрос, как та или иная биологическая система будет реагировать на ее возмущение, вносимое либо тем или иным природным образом, либо с помощью мутагенеза, либо введения того или иного лекарства, либо, в общем, ингибитора, представленного малой молекулой. Представляло интерес изучить изменения в клетке кишечной палочки, проявляющей после обработки мутагеном, устойчивость к действию мишенного ингибитора роста этих клеток. Краткому описанию этого исследования посвящена следующая глава.

ОБ ИНДУКЦИИ С ПОМОЩЬЮ МУТАГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К ЛЕТАЛЬНОМУ ДЕЙСТВИЮ МИШЕННОГО ИНГИБИТОРА КЛЕТКИ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ

Из приведенного материала следует, что возникновение хемоустойчивости клетки связано с изменениями работы различных генетических механизмов. На примере простой природной клетки, каковой является хорошо изученная микробная клетка кишечной палочки *Escherichia coli*, предоставляется возможность изучения обуславливающего хемоустойчивость ответа клетки на действие мутагена и вероятности таких генных изменений, в результате которых действие ингибитора на клетку предотвращается. Наиболее информативен и удобен для исследований этой проблемы подход, связанный с использованием мишенного ингибитора, мишень действия которого в клетке надежно установлена. Таким ингибитором является фосфоновый аналог аминокислоты глицина — N-[фосфонометил]-глицин — глифосат, обладающий ярко выраженными гербицидными свойствами. Оказалось, что мишенью действия этого соединения является шестой фермент шикиматного пути синтеза, ведущего к образованию в клетках бактерий, грибов и растений, но не животных ароматических аминокислот — триптофана, тирозина и фенилаланина. Это фермент 5-энолпирувил-3-фосфат-шикиматсинтаза (EPSPS) (рис. 12.1) [1, 2].

Ясно, что изменения с помощью мутагена в сайте связывания этим ферментом глифосата, позволят клеткам нормально расти в присутствии этого ингибитора. Такой же эффект вызовет повышение в клетке концентрации этого фермента и следовательно сайта связывания данного ингибитора, что происходит при амплификации гена данной мишени. Таким образом, один из механизмов, обуславливающих нечувствительность клетки к мишенному ингибитору, связан с изменениями в гене его мишени и числе копий этого гена в клетке. Представляло интерес изучить, как часто используется клеткой мишенный механизм по сравнению с возможными другими механизмами защиты ме-

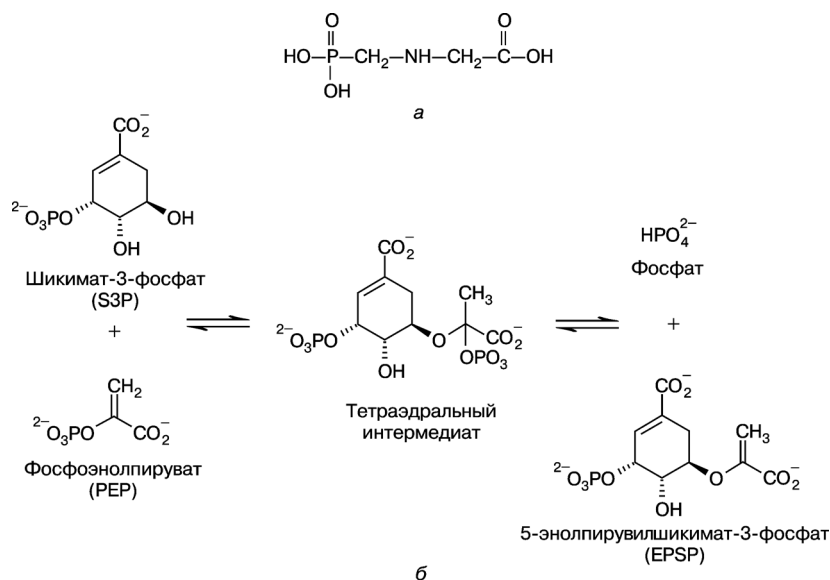


Рис. 12.1. Структурная формула глифосата (а) и реакция образования 5-энолпирувилшикимат-3-фосфата на шикиматном пути синтеза, катализируемая с помощью EPSPS (б) [32]

таболизма от повреждений. В ранней работе [3] было показано, что такой мутаген, как этиметансульфонат — EMS изменяет кодирующий EPSPS ген *aro A* у бактерий с вероятностью 10^{-6} . Мутанты же, устойчивые к глифосату, возникают в 100 раз чаще (с вероятностью 10^{-4}). Это должно означать, что в геноме клетки существует много генов, от состояния которых зависит фенотип ее устойчивости, в частности к антиметаболитам. Какие же механизмы хемоустойчивости определяют эти гены? Ответ на этот вопрос позволяет определить имеющиеся в распоряжении клетки средства, с помощью которых возможна защита метаболических мишеней, функционирующих в неблагоприятных условиях.

Для изучения этих генов мы выбрали клетки *E. coli*, поскольку они, в отличие от других бактерий, не могут использовать глифосат в качестве источника фосфора и, следовательно, не проявляют активность соответствующей С—Р-лиазы, разрушающей глифосат [4]. Это несколько сужает круг предпринимаемого поиска. Поскольку для этих бактерий известны штаммы доноров, передающих с помощью конъюгации между клетками свои гены реципиентам, то только гены донорной клетки, обработан-

ной мутагеном, можно передавать необработанному реципиенту в виде отдельных кусков, а не целого подвергнутого мутагенезу генома, и это облегчает идентификацию генов, мутация в которых приводит к глифосатустойчивости. Штаммы доноров могут переносить свою хромосому, имеющую вид кольца, разрывая ее в различных местах и в разных направлениях — либо по, либо против часовой стрелки. Мы выбрали прототрофный донор HfrC с полностью интактными генами, направление переноса которых от донора к реципиенту такое, что ген *aroA* поступает в клетки реципиента последним по времени передачи всей донорной хромосомы. Следовательно, прерывая перенос генов ближе к концу ее передачи можно исключить из создаваемой для изучения коллекции мутаций те, которые изменяют состояние гена *aroA*.

Для идентификации генов, мутации в которых обуславливают фенотип глифосатустойчивости, клетки донора HfrC обрабатывали двумя видами мутагенов: этилметансульфонатом (EMS) и нитрозогуанидином (NG). О механизме действия первого можно прочитать в [5], второго — [6]. Несмотря на сходство их действий и на то, что NG является супермутагеном по сравнению с другими алкилирующими мутагенами, он у многих авторов заслужил репутацию жесткого агента, действующего на геном так, что в разных местах возникают мутации и особенно велик выход двойных мутаций. Этот недостаток NG устраняется в наших опытах за счет возможности отсекаания эффектов на уровне всего мутированного генома при частичном переносе генов из обработанной NG клетки в необработанную. Более того, оказалось, что активность NG зависит от способа укладки бактериальной хромосомы в клетке так, что при ослаблении активности ДНК-гиразы, отвечающей за топологию генома, NG становится для бактериальной клетки менее токсичным и менее мутагенным [7]. Этот мутаген привлек наше внимание.

Прежде всего, мы показали, что при концентрации обоих мутагенов, обуславливающей 50%-е выживание обрабатываемых клеток, абсолютно одинаков выход на минимальных средах, содержащих 400 мкг/мл глифосата, устойчивых мутантов, не утративших свойство прототрофности (ни один из генов метаболизма не поломан: все необходимое для жизни делают себе сами), (вероятность возникновения 10^{-4}). Для того чтобы определить, как гены, мутации которых обуславливают устойчивость, локализируются в геноме *E. coli*, мы передавали хромосому каждого мутанта чувствительному реципиенту в течение 4 ч. Передача прерывалась через каждый час, и трансконъюганты, образующиеся между чувстви-

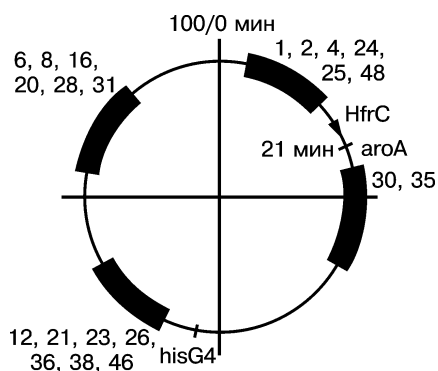


Рис. 12.2. Расположение в геноме кишечной палочки 21 глифосат-устойчивых мутаций при передаче хромосомы в течение 4 ч с прерыванием передачи через каждый час

тельной реципиентной и устойчивой донорной клетками, высевались на минимальные среды, содержащие глифосат и стрептомицин, убивающий донорные клетки. На рис. 12.2

показано расположение генов глифосатустойчивости в геноме *E. coli*.

Неожиданный результат при изучении глифосатустойчивых мутантов был получен при поиске ответа на вопрос, с какой вероятностью возникают мутанты, устойчивые к глифосату, по сравнению с другими антиметаболитными ингибиторами — аналогами аминокислот S2-аминометил-*L*-цистеином, 5-метилтриптофаном, F-фенилаланином (мишени действия неизвестны) и аналогом основания 6-азаурацилом (мишень — продукт гена *pur H*). Оказалось, что в одной и той же популяции клеток, однократно обработанных мутагеном, мутанты, устойчивые к разным ингибиторам, возникают с одной и той же и достаточно высокой частотой (10^{-4}). Отсюда следовало, что каких-то специализированных генов, отвечающих только за хеморезистентность, быть не может, так как всей емкости генома не хватило бы для вмещения генов лишь этого типа. Возникла необходимость установления в случае этих мутантов фенотипа множественной устойчивости. При использовании только трех разных ингибиторов 17 из 21 изученных глифосатустойчивых мутантов оказались множественными. Могла ли мутация активировать работу какого-то из многочисленных белков-экспортеров, выводящих различные соединения из клеток кишечной палочки? Ответ на этот вопрос позволяют получить результаты клонирования фрагментов мутантной ДНК, способных передать признак устойчивости как доминантный чувствительным клеткам. Клонирование проводили стандартным образом. Как показано на рис. 12.3 ДНК, выделенную из устойчивых мутантов, подвергали частичному гидролизу с помощью рестриктазы *Sau 3A*, что создает набор фрагментов в широком диапазоне. Он определяется положением в геле при электрофорезе фрагментов ДНК фага лямбда с извест-

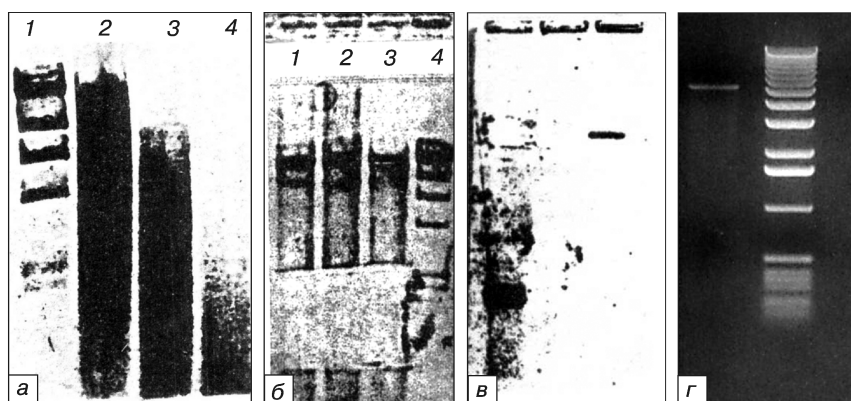
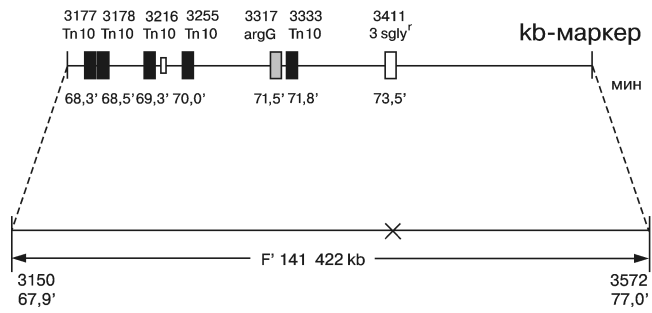
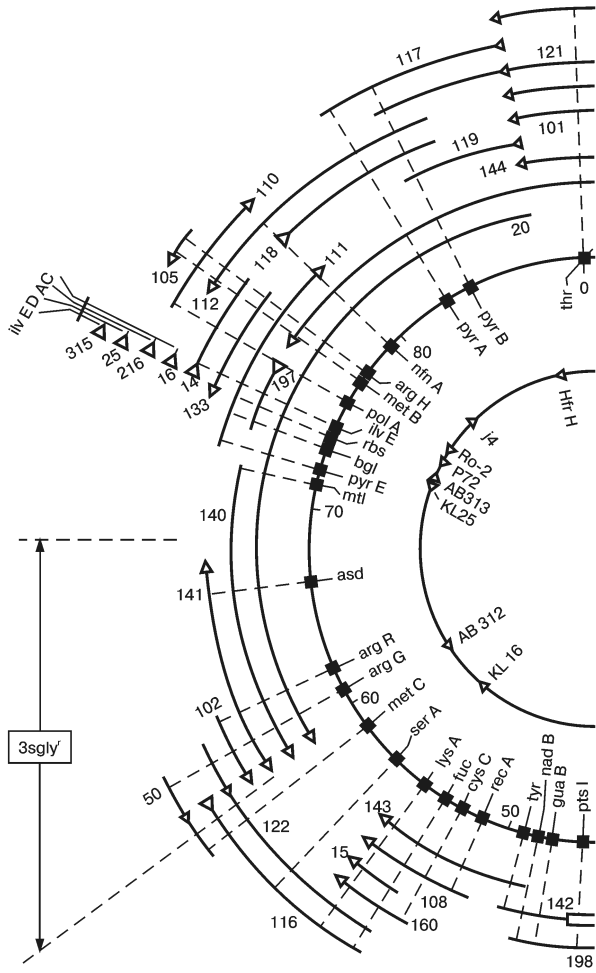


Рис. 12.3. Этапы получения библиотеки генов глифосатустойчивого мутанта *E. coli*:

a — гидролиз ДНК мутантов с помощью рестриктазы *Sau3A*, *б* — получение фрагментов клеточной ДНК, размер которых соответствует показанной области геля; *в* — четкая полоса линейризованных молекул вектора; *г* — поведение лигазной сшивки линейризованных молекул вектора с фрагментами ДНК изучаемых мутантов; *1* — положение фрагментов ДНК фага лямбда; *2–4* — гидролиз ДНК мутантов с помощью рестриктазы *Sau3A*

ным размером, которые используются в качестве маркера положения того или иного размера. Область геля, содержащую фрагменты размером от 2 до 0,5 kb, вырезали и ДНК элюировали стандартным образом. Полученные молекулы сшивали с ДНК *pBluescript SK* векторной молекулой, линейризованной из кольцевой формы за счет возможности разрезания молекулы лишь в одном месте с помощью рестриктазы *BamH1*. Концы молекул, полученные под действием *Sau3A* и *BamH1*, могут объединяться между собой, и специальный фермент лигаза может окончательно сшивать вектор с фрагментами, образуя библиотеку молекул, вид которых завершает рис. 12.3, *г*. ДНК вектора необходима, так как без нее фрагменты ДНК, введенные в клетку, обречены на уничтожение, векторная же молекула устроена так, что способна размножаться в клетке в виде автономной структуры, обеспечивая надежное существование введенных фрагментов в виде рекомбинантной ДНК. Более того, векторная молекула содержит гены, чаще антибиотикоустойчивости, что позволяет на содержащих антибиотики средах выбирать из популяции клеток только те, в которые попали изучаемые фрагменты. Более того, на специальных средах клетки-трансформанты имеют различную окраску: колонии синего цвета представлены трансформантами,



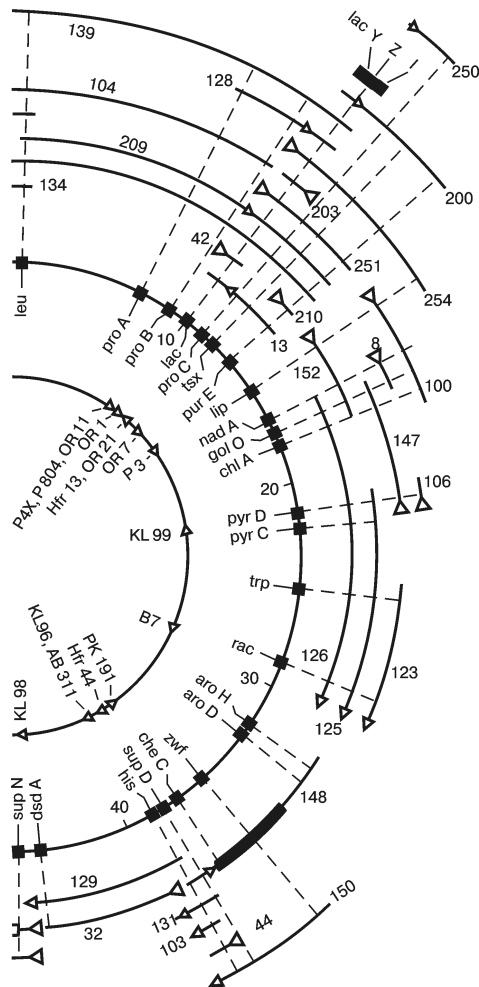


Рис. 12.4. Генетическая карта хромосомы кишечной палочки [23] и ее фрагмент размером 422 kb, в котором располагается мутация глифосатустойчивости $3sgly^+$, сцепленная с $arg G$

которые содержат пустой вектор, и белого цвета, вектор которых нагружен изучаемыми фрагментами [8].

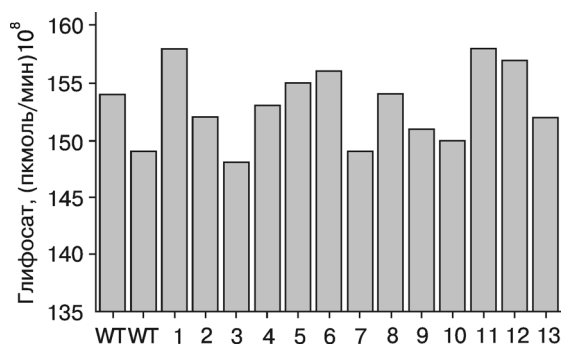
Как вводится полученная библиотека сшитых с вектором изучаемых фрагментов ДНК в клетки? В случае кишечной палочки оказалось, что если это невозможно для клеток, выращенных в обычных условиях, то, например, обработка клеток $CaCl_2$ в условиях холода делает этот процесс возможным для большого числа клеток, получивших название трансформантов [8].

При изучении способности фрагментов ДНК 8 глифосатустойчивых мутантов (по 2 из каждой области генома, показанных на рис. 12.2) не было получено ни одного глифосатустойчивого трансформанта. Это указывало на то, что мутация, обуславливающая глифосатустойчивость, задевает ген, который в диплоидном состоянии (т. е. один из них в хромосоме в виде аллели дикого типа и другой — в векторе в виде мутантной аллели) ведет себя не как доминантный (каким должен быть активированный экспортер), а как рецессивный (функция которого не проявляется). Представляло интерес провести тест на рецессивность — доминантность глифосатустойчивой мутации.

С этой целью мы выбрали множественный мутант *3sgly^r*, конъюгационное картирование которого показало тесное сцепление с ауксотрофным маркером *arg G* (71,5 мин карты хромосомы, вся хромосома включает 100 мин времени передачи хромосомы от донора реципиенту) (рис. 12.4).

Следовательно, если эту область сделать двойной на некотором расстоянии как вправо, так и влево от маркера *argG*, то искомый ген будет представлен в клетке дважды в виде двух разных аллелей, и это позволит определить природу каждой аллели. Сделать эту область хромосомы двойной можно с помощью конъюгационного введения в клетки так называемого полового фактора — эписомы *F'*, отвечающей за контакт между клетками реципиента и донора. В отличие от передачи хромосомы этот фактор вносится в клетки очень быстро, и если он содержит захваченные ним хромосомные гены, расположенные даже в конце передачи хромосомы, то такие гены в составе *F'* фактора появляются в клетке очень быстро. Для наших целей мы выбрали донор, *F'*-141 эписома которого содержала фрагмент бактериальной хромосомы размером 422 kb (размер всей хромосомы составляет 4639 kb). За короткое время контакта этого донора с ауксотрофным по аргинину реципиентом последние получали от донора неповрежденный ген *argG* и в результате этого для роста трансконъюгантов более не требовался аргинин. Поскольку эписому можно ввести только в реципиентные клетки, а мутацию *3sgly^r* несли доноры, то мы вначале передали эту мутацию из донора реципиентам, отбирая трансконъюганты, не способные расти без аргинина, но устойчивые к глифосату и еще ряду использованных ингибиторов. При внесении в такие сконструированные реципиенты эписомы *F'*-141 оказалось, что получающиеся трансконъюганты, способные расти без аргинина, становились чувствительными к летальному действию глифосата и других использованных ингибиторов. Возможность эписомной передачи из этих же трансконъюгантов новым клеткам реципиентов доказывала поддержание диплоидности по данному участку хромосомы, и, следовательно, изучаемая мутация устойчивости возникает в рецессивном гене. Такой ген в мутированном состоянии не может отвечать за выброс соединения из клетки, но при поломке его поступление ингибитора в клетку может прекратиться, что и приведет к хемотроустойчивости. Возникла необходимость изучения, как ингибитор поступает в глифосатустойчивые мутанты по сравнению с клетками дикого типа. Более того, может ли

Рис. 12.5. Уровни C^{14} -глифосата в чувствительных клетках контроля и в клетках глифосатустойчивых мутантов. WT — контроль; 1—13 — номера мутантов



множественность устойчивости быть обусловленной возможностью одновременного изменения в уровнях поступления различных соединений в клетку?

Наличие радиоактивного глифосата дало нам возможность изучить характер поступления этого вещества в клетки кишечной палочки. Оказалось, что в отличие от многих соединений, транспорт которых в клетку исследовался, глифосат не обладал способностью даже сорбироваться клеткой *E. coli*. Возникало ощущение, что он поступает в эти клетки медленно и, возможно, поэтому действие его проявляется в условиях минимальной среды и длительного времени инкубации. Глобальный мутагенез с помощью транспозона выявил в клетках микоплазмы две кассеты генов, осуществляющие транспорт внутрь клетки и представленные соответствующими ABC-переносчиками. Одна кассета отвечает за поступление в клетку фосфата, другая, — предположительно, фосфоната [9]. В клетках микоплазмы, очевидно, возможен перекрест между ними в отличие от клеток *E. coli*. Для того чтобы надежно сравнивать уровни поступления глифосата в чувствительные контрольные и устойчивые клетки мутантов, необходимо было ускорить время поступления ингибитора в клетку. Это оказалось возможным при использовании клеток, обработанных холодным $CaCl_2$ и в присутствии диметилсульфоксида [10]. В этих условиях удалось проследить активный транспорт глифосата, медленно поступающего в клетки с большой величиной K_m , составляющей 274 мкМ и на который не оказывает влияния присутствие фосфатных ионов, глицина и других аминокислот, принадлежащих одной группе поступления веществ в эти клетки. Это указывало на то, что имеется специальная система для проведения фосфонатов в случае кишечной палочки, и возникал вопрос о том, как часто эта система может выходить из строя. Данные измерения уровней поступления глифосата в чувствительные и 12 устойчивых мутантов представлены на рис. 12.5.

Глифосат поступает в устойчивые клетки точно так же, как и в чувствительные и, следовательно, не с этим процессом связан механизм возникновения устойчивости этих мутантов к ингибитору.

Итак, из трех процессов — вхождение, выброс и распределение в клетке, в которые вовлекается вещество, добавленное к клеткам, нарушения первых двух происходят редко, очевидно, часто становится почему-то невозможным распределение вещества в клетке. Однако для такого утверждения следует знать, что мутаген не способствует включению обходных путей инактивированной мишени и не стимулирует возможность структурной мимикрии молекул, из-за которой ингибитор связывался бы с такими молекулами, а не с настоящей мишенью. Кратко охарактеризуем понятие об обходных путях метаболических блоков в клетке.

Еще в рамках формулы один ген — один фермент было замечено, что при поломке в клетке какого-то гена и полном отсутствии соответствующей ферментативной активности наблюдаются случаи выживания клетки. Ясно, что в клетке имеются какие-то возможности для компенсации такого дефекта. (При использовании техники нокаута генов эти случаи стали особенно заметными.) В результате таких наблюдений возникло понятие об обходных путях того или иного метаболического блока (*metabolic bypass*). Теории этого явления еще не существует, и это — область примеров [11,12]. Однако эта область наблюдений становится важной при становлении системной биологии, преследующей цель раскрытия законов организации систем, возникающих свойств, преимуществ и устойчивости функционирования. Мы также остановимся на примерах, показывающих, что одним из эффективных способов изучения обходных путей инактивированной мишени является изучение так называемых артефактов клонирования.

Модельный эксперимент с использованием систем биохимических реакций, в пути протекания которых возможен обход нефункционирующего звена, наиболее удобен для изучения возможности стимуляции обходных путей метаболизма с помощью мутагена. Такой системой является синтез пуринов у прокариот.

Пути синтеза пуринов досконально изучены: это путь *de novo*, стартовый на основе малых молекул клетки, *salvage* — дополнительный путь, реутилизирующий распадающиеся компоненты нуклеиновых кислот, и шунт, соединяющий эти два пути [13—15]. Если каждый путь и шунт перекрыть благодаря мутации или делеции и с помощью библиотеки генов клонировать фрагменты, комплементирующие такие мутации, то должно быть толь-

ко три типа таких фрагментов. Однако их клонируется больше [16]. Ясно, что «лишние» типы клонированных фрагментов отражают возможности клетки обходить блок. Подтверждением того, что изучение «артефактов» клонирования может быть методом изучения обходных путей, служит работа [17]. Дефектные по системам репарации одноклеточных разрывов клетки, чрезвычайно чувствительные к УФ-излучению, трансформировали банком генов в мультикоопийных плазмидах и отбирали клоны, устойчивые к УФ. Анализ таких клонов показал, что указанный дефект исправлялся с помощью неожиданной активности RNase T, необходимой для процессинга tRNA и 5S RNA. Это может быть только в том случае, если RNase T наряду с РНКазной обладает и ДНКазной активностью 3'—5'-полярности. Ясно, что изучение обходных путей и с позиций системной биологии открывает новые перспективы в исследовании организации клеточного метаболизма и устройства клетки.

При обнаружении «лишних» (или, как ранее считали, артефактных) фрагментов ДНК, восстанавливающих образование GMP в клетках, без чего они не могут расти на средах, содержащих гуанин, мы обратили внимание на фрагмент, содержащий два SacI-сайта. Таковых нет ни в одном из генов путей синтеза пуринов у прокариот. Секвенирование этой последовательности показало гомологию с мембранным Y-белком *E. coli*, который может быть вовлечен в метаболизм такой сигнальной молекулы, как ppGpp [16, 18, 19].

Более того, оказалось, что в реакции ПЦР амплификации при использовании 20-членных праймеров (затравок для синтеза ДНК) к N- и C-концам гена *hpt* (кодирующего трансферазу, способную присоединять фосфорибозил к гипоксантину и гуанину с получением GMP) образующийся ампликон этот ген не содержит. Какую же роль может играть такая последовательность в синтезе пуринов в клетке?

Итак, артефакты клонирования генов, определяющих пути синтеза пуринов в клетках прокариот, выявляют его большой запас прочности, в котором соответствующее место может занимать возможность метаболического обхода того или иного нефункционирующего звена в цепи создания того или иного метаболита в клетке. Может ли мутаген стимулировать активность обходных путей? Если это так, то уровень ревертантов клеток с поломками в путях синтеза пуринов должен быть значительно выше для клеток, обработанных мутагеном по сравнению с необработанными.

ными клетками. Оказалось, что это не так и различия в этом уровне не наблюдаются. Отсюда следует, что возникновение у мутантов устойчивости к мишенному ингибитору не связано с активацией путей, обходящих мишень. Более того, в случае 8 мутантов при клонировании не было обнаружено ни одного фрагмента ДНК, сообщающего чувствительным клеткам признак глифосатустойчивости.

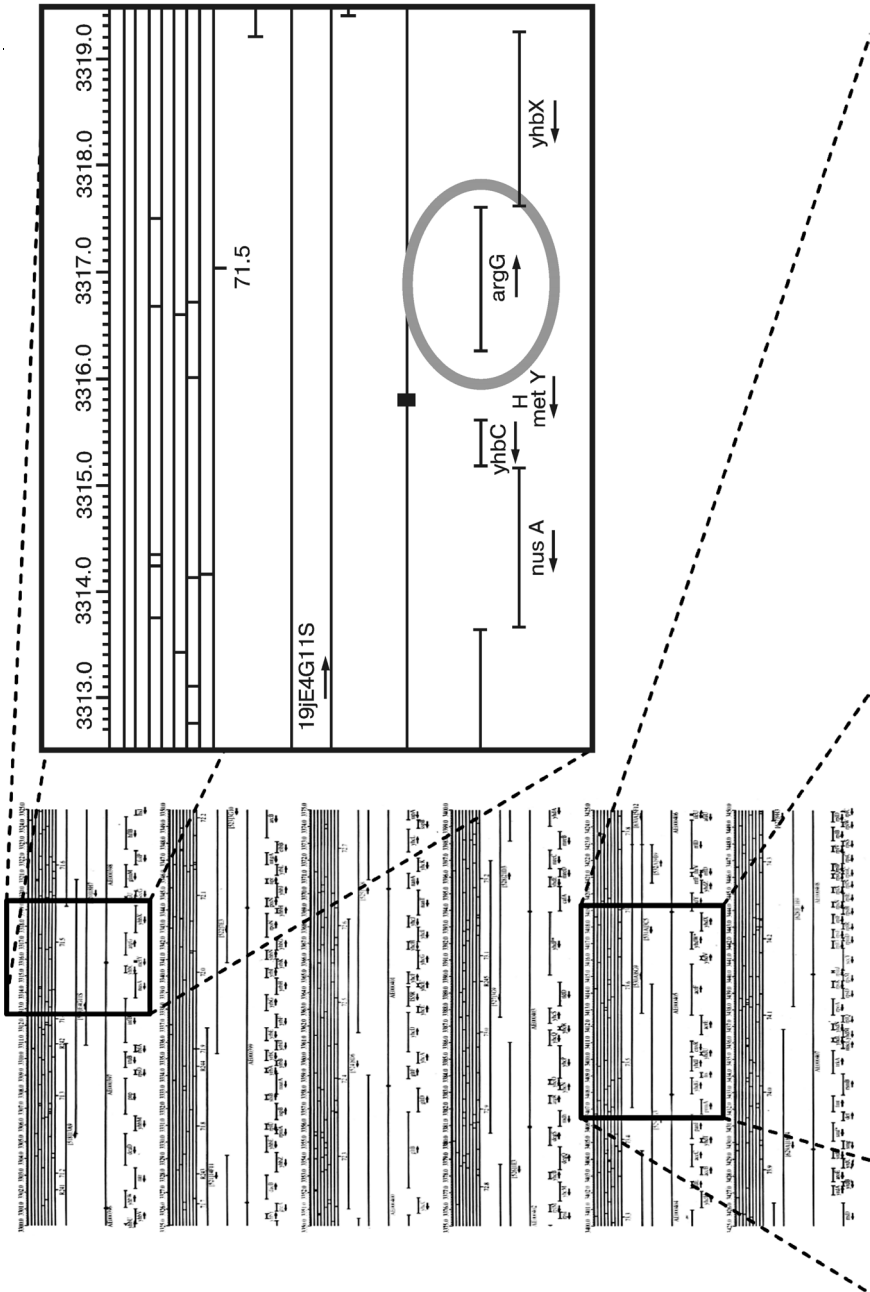
Может ли мутаген существенно увеличивать структурную мимикрию молекул так, что не в мишени, а в какой-то другой молекуле возникает сайт, способный связывать ингибитор? На этот вопрос также помогают ответить результаты модельного опыта. Если взять две молекулы клетки, похожие по структуре, но выполняющие разные функции, то можно изучить, какую роль в их судьбе играет встреча с мутагеном. Такими молекулами являются структурно очень похожие молекулы тРНК^{Phe} и РНК I [20], необходимая для запуска репликации ДНК плазмиды ряда ColE1 (большинство используемых прокариотических векторов имеют этот *ori* репликации своей ДНК). Оказалось, что повышенные количества тРНК^{Phe} способны защищать термолabileную Phe-АРСазу при непермиссивной температуре, при которой фермент продолжает работать. Мы задали вопрос, может ли это делать РНК I. Оказалось, что клетки, содержащие термолabileную Phe-АРСазу и трансформированные мультикопийными плазмидами, реплицирующимися на основе *ori* ColE1, нарастали за ночь особенно в жидкой среде, содержащей антибиотик и при непермиссивной температуре 42 °С до очень высокой плотности. В таких же условиях контрольные клетки не росли [21]. Если мутаген может выступать фактором структурной мимикрии молекул, то РНК I мутагенизированных трансформантов может часто подвергаться изменениям, и ее свойство защищать термолabileный фермент часто должно утрачиваться. Однако этого не наблюдалось. Из этого следует, что при высокой частоте возникновения глифосатустойчивых мутантов вклад возможности структурной мимикрии сайта связывания ингибитора немишенной молекулой может быть представлен лишь только какой-то самой минимальной величиной.

Итак, значительно более частое, чем возможность изменений самой мишени ингибитора и ее концентрации в клетке, возникновение устойчивых к его действию мутантов, показало, что в случае кишечной палочки фенотип устойчивости определяется состоянием многих генов, расположенных в различных местах генома. От со-

стояния этих генов не зависит процесс входа ингибитора в клетку и его выброса из клетки. Внутриклеточное распределение же ингибитора в клетке, очевидно, становится невозможным. Однако отражающиеся на таком распределении изменения в клетке, определяемые состоянием генов данного класса, касаются не только одного типа молекул, но и самых различных их типов, что и приводит к эффекту множественной лекарственной устойчивости. При этом обращает на себя внимание то, что при возникновении множественной устойчивости мутация затрагивает не один ген, а группу близлежащих или тесно сцепленных генов. Это следует из того, что при перенесении генетических детерминант фенотипа глифосатустойчивости из устойчивой в чувствительную клетку с помощью трансдуцирующего бактериофага P1, включающего в свой геном фрагменты бактериальной хромосомы, устойчивыми и к глифосату, и к аналогу лизина становятся 82 % трансдуктантов, а к глифосату и аналогу урацила — 52 %. Если бы мутированию подвергался один и тот же ген, то определяемая с помощью трансдукции величина совместной передачи устойчивости к указанным ингибиторам приближалась бы к 100 %. Обнаруженное в данном случае процентное различие отражает различия в расстоянии, на котором эти гены расположены по отношению друг к другу. Для 82 % котрансдукции — это ~4,7 kb, для 52 % — порядка 10 kb.

Интересным оказалось то, что величина выхода множественных мутантов в обработанной мутагеном популяции клеток не зависит от концентрации мутагена, от которой зависит общее число мутантов, селективируемых на средах, содержащих один из ингибиторов. Так, при концентрации мутагена, обуславливающей максимальный и минимальный выход мутантов, получаемых под действием разных мутагенов — NG и EMS, выход множественных мутантов выражался неизменной величиной. Для трех разных использованных ингибиторов эта величина составила 80 %. Это позволяет сделать заключение, что гены, от состояния которых зависит фенотип устойчивости к мишенным ингибиторам, организованы в кассеты и их отличительной чертой является особая доступность к ним мутагена. Вследствие этого возможно одновременное мутирование сразу трех изучаемых генов даже при низких концентрациях мутагена при однократной обработке клеток.

Мы задались целью обнаружить, с какими последовательностями банка генов генома *E. coli* связан фенотип глифосатустойчивости. Эти последовательности представлены согласно их генетической карте в векторной конструкции фага лямбда в виде 476 клонов



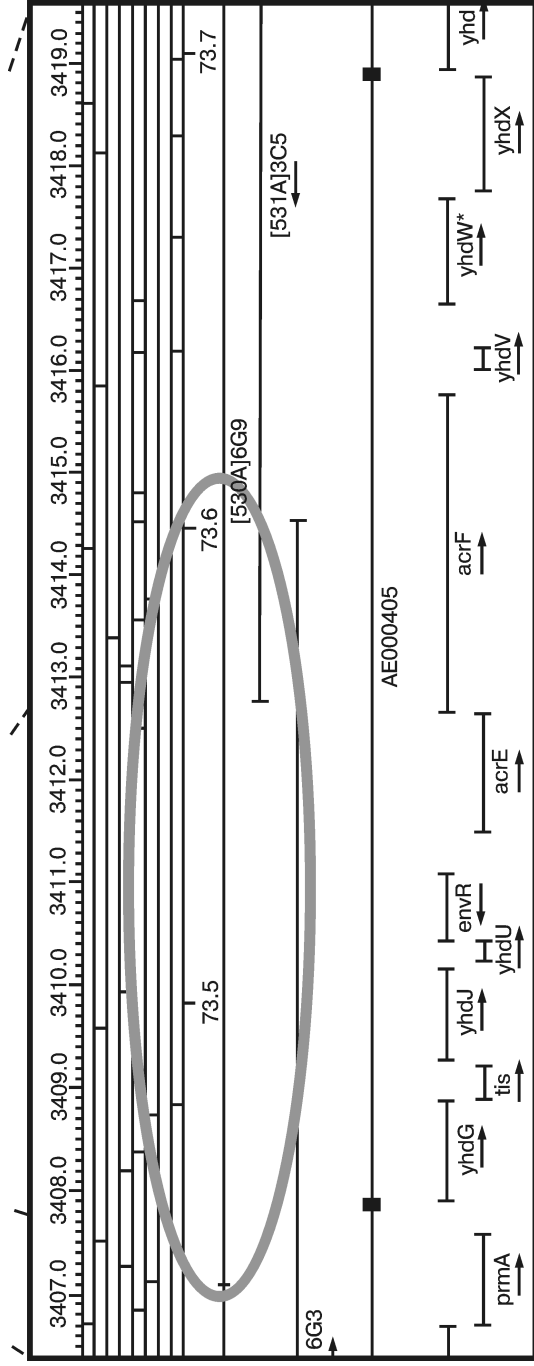


Рис. 12.6. Фрагмент физической карты хромосомы кишечной палочки, построенной на основании расположения сайтов рестрикции различных рестриктаз, содержащий маркер *argG* и прилегающие к нему последовательности, включенные в клон № 530 [22]

[22, 23], включающих генетически упорядоченные фрагменты всей бактериальной хромосомы. Данные котрансдукции маркеров *arg G* (3317 kb физической карты) и Tn10 (3333 kb) с мутацией глифосатустойчивости *3sgly^r* показали, что искомая последовательность должна находиться в пределах ~3410 kb фрагмента бактериальной хромосомы, которая содержится в клоне № 530 (рис. 12.6).

Pvu II-фрагмент вставки этого клона сшивали с ДНК вектора pBluescript SK⁺, разрезанной по сайту Eco RV. Сшитыми молекулами трансформировали глифосатустойчивые клетки мутанта *3sgly^r* и трансформанты высевали на богатую среду LB, содержащую ампициллин и индукторы, позволяющие определить цвет колонии клетки-трансформанта: синий, если в векторе не содержится вставки, и белый, если вставка в векторе имеется. Размер Pvu II-фрагмента вставки клона № 530 составляет 7,35 kb. Известно, что такие большие фрагменты в используемом векторе не клонируются. Отрабатывая необходимые этапы процедуры, мы дошли до конца и были удивлены, когда среди полученных трансформантов обнаружили колонии белого цвета. Когда плазмидную ДНК, выделенную из этих колоний, обработали рестриктазой Hind III и продукты рестрикции визуализовали с помощью электрофореза в сравнении с ДНК вектора, то в случае плазмидной ДНК белых трансформантов обнаруживалась верхняя зона и нижняя зона молекул ДНК. Размер молекул верхней зоны ДНК значительно превосходил размер молекул векторной ДНК (дорожки 1 и 2 на рис. 12.7), нижняя зона представлена молекулами небольшого размера (дорожки 2 и 3 на рис. 12.7). Положение этих зон соответствует характеристике Pvu II-фрагмента вставки клона № 530 генетически упорядоченного банка генов *E. coli* при отщеплении по его единственному Hind III сайту небольшой начальной части этого фрагмента. Оказалось, что клетки устойчивого к глифосату, аналогу лизина и урацила мутанта *3sgly^r*, трансформированные плазмидой, содержащей фрагмент Pvu II, утрачивали способность расти на глифосате и аналоге лизина, но не урацила. Из этого следовало, что гены, мутации в которых определяют устойчивость к глифосату и аналогу лизина, находятся в этом фрагменте, а ген, при мутировании которого наблюдается устойчивость к б-азаурацилу, в него не входит. Для Pvu II известны следующие гены. Это *fis*-кодирующий белок, способный связываться с нуклеотидом и выступать в качестве транскрипционного фактора rRNA оперона. Ген расположен в начале фрагмента и отрезается от него с по-

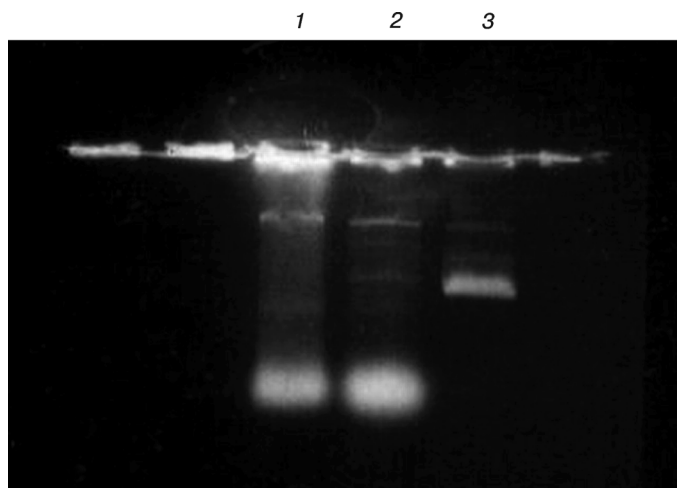


Рис. 12.7. Характер рестрикции с помощью рестриктазы *Hind* III векторной ДНК плазмиды *pBluescript SK⁺* в сравнении с рекомбинантной ДНК этой же плазмиды, содержащей *Pvu* II-вставку клона № 530 библиотеки хромосомных генов *E. coli*:

1, 2 — *Hind* III-перевар ДНК рекомбинантной плазмиды; 3 — *Hind* III-перевар векторной ДНК

мощью рестриктазы *Hind* III. За этим геном следуют еще четыре гена (рис. 12.6). Интересно, что среди них есть ген (*acr E*), играющий роль в проявлении системой *Mag* множественной устойчивости к ряду цитостатиков.

Итак, изучение возникновения устойчивости к мишенному ингибитору на примере более просто устроенной прокариотической и хорошо изученной клетки кишечной палочки показало, что эффективным индуктором возникновения такого фенотипа является мутаген. Индуцируемые им мутации возникают в многочисленных генах, расположенных в различных местах генома. Ясно, что эти гены должны выполнять самые различные функции в клетке и, претерпевая определенные изменения, как бы по совместительству сообщать клетке фенотип хемоустойчивости. Как это может происходить? Как уже указывалось, мы обратили внимание на то, что при использовании всего трех ингибиторов различной природы большинство возникающих мутантов оказались множественными, и это их свойство не связано с активацией множественных экспортеров и *MAR*-системы. На примере одного мишенного ингибитора также было показано, что не нарушается процесс поступле-

ния вещества в клетку, устойчивую к его действию. Перенос фрагментов клеточного генома с помощью трансдуцирующего фага показал, что наблюдаемая множественность связана с одновременным мутированием при однократной обработке клеток мутагеном выявляемых сразу трех генов, расположенных вблизи друг друга. Этот результат не зависел от вида мутагена и оказался одинаковым для NG и EMS. Более того, выход устойчивых мутантов зависел от концентрации мутагена, а их множественность не зависела. Из этого следует, что гены, мутирование которых определяет возникновение хемоустойчивости, организованы в геноме *E. coli* в виде кассет и характеризуются особой доступностью к ним мутагена. Это позволяет предположить, что в геноме есть домены, закрытые от контактов с малыми молекулами клетки, как бы спрятанные в толще клеточных структур и малодоступные для действия мутагена, а также свободно контактирующие с внутриклеточным пространством, которые первыми воспринимают агент, появившейся в клетке. Мы предлагаем названия для первых «доместосома» (от генов домашнего хозяйства) и для вторых — «энвиронсома» (от *environment*) [22, 23]. Такое устройство позволяло бы клетке чувствовать свое окружение и принимать меры, способствующие выживанию.

Почему клетка становится устойчивой к действию мишенного ингибитора, если в той или иной энвиронсоме произошла мутация? Характер множественности возникающих мутантов позволяет отметить предположения о рекрутировании ферментов, модифицирующих ингибиторы, а также сдвигах в соответствующих метаболических уровнях за счет генных амплификаций и активации транскрипционных факторов [3], так как тогда такие редкие события должны были бы происходить часто. Что касается возможностей транспорта ингибиторов в клетку, то поскольку изменений в характере поступления вещества в клетку и его выброса из нее нет, то нарушается процесс внутриклеточного распределения вещества, что приводит к секвестрации или невозможности встречи ингибитора и мишени. Как это может происходить? Ответ на этот вопрос ведет в область изучения конфигурации внутриклеточного пространства и молекулярных движений в клетке. Данные этого изучения подробно описаны [24, 25]. Здесь отметим следующее.

В настоящее время известны два фактора, определяющие геометрию цитоплазмы: это заполненность клетки белками и переход гибкой структуры молекулы белка от неупорядоченного состояния к полностью жесткоупорядоченной структуре [26—28].

Обращаем внимание, что изучение свойств белков осуществляется в основном в разбавленных растворах (0,1 %), в клетке же их концентрация составляет от 20 до 35 % [27]. Автор обзора [27] подчеркнул: «The persistent neglect of this property by biochemists should be remedied» (*следует положить конец постоянному игнорированию этого свойства биохимиками*). Известно, что в концентрированных растворах белков константы молекулярных ассоциаций между различными молекулами белков значительно увеличиваются, и это должно изменять рисунки внутриклеточного пространства и возможности экспонирования в него различных участков белковой молекулы [28]. Интересно отметить, что одна из особенностей злокачественной клетки состоит в заполненности ее белками, что, очевидно, также способствует проявлению ею фенотипа лекарственной устойчивости.

Обработка нормальных клеток мутагеном не может значительно изменить состояние заполненности клетки белками. Поэтому для объяснения возникновения при однократной индукции большого количества множественных мутантов, в клетках которых свободное распространение ингибиторов становится невозможным, мы привлекаем в качестве фактора изменения рисунка внутриклеточного пространства. Это превращение возможно за счет мутации, переводящей гибкую в жесткую структуру белков, кодируемых энвиронсомами. Поскольку дикая аллель гена энвиронсомы детерминирует гибкую структуру, обладающую большей плотностью упаковки и большей эффективностью ассоциаций с другими молекулами белков [28], то при объединении в одной клетке дикой и мутантной аллелей гена первая должна быть доминантной. Это и наблюдается в эксперименте [29]. Предполагается также, что специфический рисунок внутриклеточного пространства, создаваемый вызываемыми мутацией структурными переходами белков, кодируемых энвиронсомами, является фактором секвестрации для одних, но, возможно, не для других молекул.

Если развиваемая здесь идеология может быть подтверждена экспериментально, то встает вопрос о путях преодоления хемотростойчивости, возникающей вследствие мутирования генов энвиронсом. Вызывает интерес возможность воздействия на рисунок внутриклеточного пространства с помощью введения в клетки крупных полимерных средств и наночастиц, действующих как молекулярные стенты, подобно пришедшим на смену баллонов Andreas Gruentzig приспособлениям, что расширяют просвет кровеносных сосудов сердца при инфарктах.

В пользу правильности представления о возможности существования геномного домена энвиронсом может свидетельствовать тот факт, что встраивание вирусного генома в геном клетки приводит при всех прочих равных условиях к увеличению выхода множественных мутантов от опыта к опыту в 2—3 раза (неопубликованные данные). Более того, оказалось, что трансконъюганты, или дочерние клетки, возникающие в результате рекомбинации между глифосат чувствительными родительскими клетками доноров и реципиентов генетической информации, выдерживают концентрации ингибитора, в 6 раз превосходящие те, которые выдерживают исходные родительские формы этих клеток [30]. Связан ли процесс рекомбинации с возможностью энвиронсомных изменений так, что лиганд полностью не секвестрируется, но скорость его распространения в клетке значительно уменьшается [24]? Если это так, то, очевидно, не только мутаген, но и перестроечные процессы ДНК, и роль экзогенных молекул ДНК, поступивших в клетку, могут оказаться значимыми в приобретении клеткой устойчивости к ингибиторам. Интересно, что в случае генетической трансформации клеток бактерий сенной палочки ДНК насекомых проникала в клетки активнее трансформирующей бактериальной ДНК [31]. Отметим, что ДНК насекомых отличается от ДНК других видов, прежде всего, тем, что не содержит цитозин, метилированный по 5-му положению. Такой результат указывает на то, что попадание в клетку экзогенных молекул ДНК помимо мутагенного загрязнения окружающей среды может выступать в качестве экологического фактора возникновения множественной лекарственной устойчивости за счет изменения состояния энвиронсом.

Таким образом, в изучении проблемы возникновения множественной лекарственной устойчивости, которое в настоящее время базируется в основном на исследованиях множественных экспортеров, предлагается новый подход, основанный на изучении возможностей изменений в геометрии внутриклеточного пространства, которая определяет условия свободного потока в клетке веществ и доступ лиганда к метаболической мишени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Если представить, что созидание на нашей планете жизни и клетки как самодостаточной элементарной единицы происходило как бы по плану, то он поражает грандиозностью изобретения различных необходимых для поддержания жизни элементарных базовых процессов и систем взаимодействий, а также всеобщей их взаимосвязанностью и координированностью. Также поражает, что в целях самосохранения такой сложно организованной воспроизводящейся системы клетка снабжена молекулярными средствами, способными защищать ее от непредвиденных ударов, возникающих при неблагоприятных условиях функционирования. Один из таких ударов — воздействие на клетку химических молекул. Существование жизни в окружающей среде основано на взаимодействии организма со средой его обитания и осуществляется оно в основном с помощью малых молекул. Их можно разделить на нужные для жизни и ненужные. Последние называют ксенобиотиками. То, что они попадают в клетку, позволило П. Эрлиху сформулировать идею о возможности создания «волшебных пуль», или химических соединений, способных выводить из строя в клетке лишь определенный вид ее компонентов, т. е. определенные мишени. В рамках этого понятия Эрлих создал термин «химиотерапия». Ясно, что основное назначение химиотерапии заключается в возможности избирательного уничтожения клетки. Выполнение этой задачи в более широких рамках фармакотерапии необходимо для уничтожения микробной клетки как инфекционного пандемического начала, клетки, зараженной вирусом, и злокачественной клетки. Оказалось, что на пути решения этой задачи по уничтожению нежелательной клетки встает такая универсальная труднопреодолимая проблема, как возникновение устойчивости к действию того или иного химического начала. В основе этой проблемы лежит активация природных молекулярных механизмов клетки, которые защищают ее и тем или иным способом нивелируют действие

малых молекул, используемых в качестве основных лекарственных средств. Настоящая книга представляет попытку суммирования результатов изучения этих механизмов, противодействующих предпринимаемым усилиям по уничтожению микробной и злокачественной клеток.

В случае микробной клетки разнообразие антимикробных средств, созданных особенно в эру антибиотиков и имеющих, как суммировано на рис. 3.1 [1], самые различные механизмы действия, позволяет выделить четыре основные группы защитных механизмов клетки от цитостатического действия малых химических молекул:

- разрушение или инактивация лекарства в клетке, либо его химическая модификация, уничтожающая действующее начало лекарства;
- изменения в мишени действия лекарства, делающие мишень нечувствительной к этому действию;
- возможность изменений в путях синтеза в клетке того или иного метаболита, необходимого для жизни клетки;
- изменения в работе транспортных средств на уровне клетки, отвечающих за вход лекарства в клетки и его выход из клетки.

Используемые механизмы защиты этих клеток делятся на две группы. Одна из них связана с привнесением в клетку извне за счет мобильных генетических элементов генов, обезвреживающих антимикробные агенты. Особой силой защиты обладает такой генетический элемент, как интегрон, устроенный так, что благодаря особому механизму рекомбинации между определенными последовательностями ДНК он выбирает из генома те гены обезвреживания, которые обладают такими последовательностями, и за один цикл репродукции клетки интегрон может собрать в себя целую кассету из таких различных генов детоксикации, одновременно обеспечивающих множественную лекарственную устойчивость.

Другая группа защитных механизмов микробной клетки определяется ее внутренними потенциями. Наиболее изучены из этих потенций мутационные изменения генома и следовательно изменения мишени действия лекарства, регулоны глобального ответа клетки на вредное воздействие, системы переносчиков малых молекул в клетку и из клетки, а также закрытие входа лекарства в клетку через порыны в ее мембране. Более того, помимо этих, в основном изучаемых в настоящее время групп механизмов хемоустойчивости, мы поставили вопрос о роли конфигурации внутреннего пространства клетки и факторов его измене-

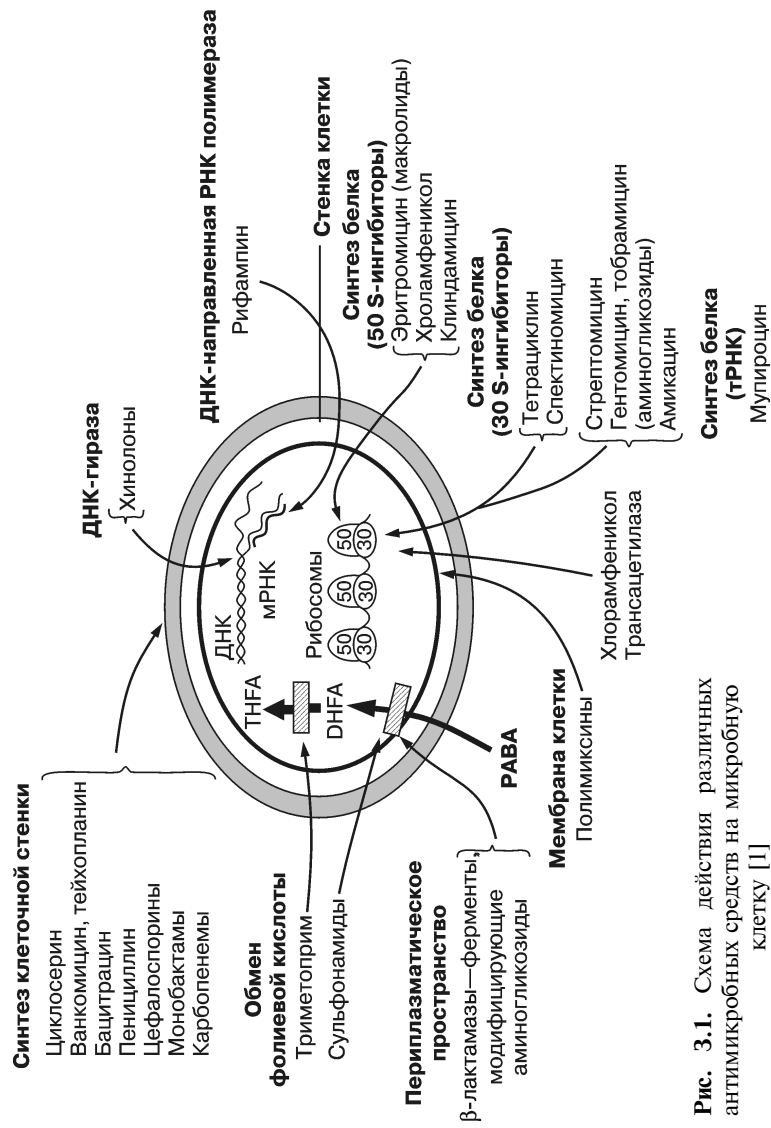


Рис. 3.1. Схема действия различных антимикробных средств на микробную клетку [1]

ний, влияющих на распределение малых молекул в клетке, и вероятности их встречи с мишенями. Возможно, клетка может довольно часто использовать именно этот механизм хемоустойчивости, не привлекая до настоящего времени большого внимания. Если конфигурация внутриклеточного пространства значима, то должна ли упаковка белков клетки быть какой-то оптимальной и без элементов хаотичности, должна ли заполненность клетки белками также быть какой-то оптимальной и какой эффект могут вызывать сдвиги этого показателя при изменениях уровней экспрессии разных генов? Эти вопросы ждут своего решения.

Что касается злокачественной клетки, то установленные механизмы множественной устойчивости суммирует рис. 3.2 (см. вклейку) [2].

Установленные механизмы хемоустойчивости раковой клетки в настоящее время также можно представить тремя основными группами:

- активация молекулярных средств клетки, снижающих внутриклеточную концентрацию лекарства;
- изменение условий и характера взаимодействия между лекарством и мишенью, включая возможность секвестрации лекарства в клетке;
- изменения в ответе клетки. Они позволяют ей пережить действие стресса, увеличить активность процессов, репарирующих поврежденную ДНК, отменить программу включения апоптоза при возникновении в клетке соответствующих дефектов.

Представленные на рис. 3.2 молекулярные средства хемозащиты клетки являются ее регулярными структурами. Они активируются в тех или иных условиях при участии организованной системы протеинкиназ и регуляторов клеточного цикла, призванных улавливать и интерпретировать сигналы различных состояний клетки и окружающей среды, формировать язык сообщений и приказов, а также определять необходимые эффекторные, или исполнительные, функции.

Помимо регулярных структур клетка в форс-мажорных условиях также эксплуатирует принцип самоорганизующихся формирований. Благодаря свойствам мобильных генетических элементов использование генома в зависимости от обстоятельств может быть изменено так, что прочтение его информации в необычном сочетании элементов может предоставить клетке шанс пережить тот или иной удар. В настоящее время раскрыта суть этого принципа увеличения степени разнообразия генетической информации, де-

тали же активации мобильных элементов остаются неизвестными. Более того, привлекают внимание приведенные в книге данные о том, что отличительной чертой злокачественной клетки является нарушение природного хромосомного баланса клетки — анеуплоидия, и чем она выраженнее, тем тяжелее проблема множественной лекарственной устойчивости. С нашей точки зрения, этот факт также указывает на важную роль конфигурации внутреннего пространства клетки. Известно, что при малигнизации клетки характер экспрессии большого числа генов резко изменяется и превалирует *upregulation* нежели *downregulation*, т. е. клетка забивается белками. Не является ли это причиной того, что в таких плотных клетках движение хромосом затрудняется, создаются условия для появления отстающих хромосом в анафазе, и при делении клетки в таком состоянии возникает анеуплоидия? В этом состоянии движение в клетке затруднено не только для хромосом, но и для малых молекул, поэтому и возникает множественная лекарственная устойчивость, при которой лекарства в таких плотных клетках не могут найти свои мишени. Не является ли задачей стрессового протеома (как группы белков, синтезирующихся в клетке только в условиях стресса), содержание которого в клетке резко увеличивается при действии неблагоприятных условий, выполнять еще и функцию физического уплотнения клетки, способного изменить ее физиологические режимы? В связи с этим привлекает внимание обнаруженная для всех царств жизни закономерность общности и значительной гомологии белков стрессового протеома, и это позволяет считать, что его происхождение имело монофилетический или какой-то один и тот же источник [3].

Каким же может быть выход из ситуации столпотворения белков в клетке? Ясно, что, наверное, можно найти, скорее случайно, малую молекулу, которая окажется способной двигаться в таких клетках. Следует отметить, что при таком положении дел появляются работы, обращающие внимание на то, что «грязные» (немишеннные лекарства) могут оказаться более эффективным и перспективным материалом для преодоления хемоустойчивости [4]. Использование наночастиц может оказывать на клетку локально сдавливающий либо, напротив, расслабляющий эффект и изменять конфигурацию внутриклеточного пространства так, что малая молекула сможет в клетке двигаться. Эта возможность изучается, особое внимание привлекают углеродные трубки, или нанобриллианты, как средства эффективной доставки лекарства в клетку и эффективной терапии.

Мерой борьбы с хемоустойчивостью, обусловленной значительным уплотнением клетки, является возможность управления уровнем экспрессии многочисленных генов в раковой клетке. В связи с этим большое внимание привлекают такие управляющие экспрессией генов молекулы, как miR, которым посвящена специальная глава книги. Более того, эффект модуляции экспрессии гена определяется таким эпигенетическим фактором, как метилирование и деметилирование цитозина по 5-му положению кольца данной молекулы в генетических последовательностях, в которых никаких текстовых изменений не происходит. Достижения в области эпигенетики также суммированы в специальной главе.

На современном этапе исследований в биологии становится ясным, что редуccionистский подход к изучению биологических явлений, т. е. дробление целого на части и изучение частей по отдельности, исчерпывает свои возможности. Формируется системное мышление и системный подход к изучению биологических явлений и на молекулярном уровне. Основополагающее значение этого подхода состоит в том, что объединение частей в целое, в систему приводит к возникновению того или иного фенотипа, нового свойства клетки, вытекающего из свойств сформированной системы взаимодействий клеточных структур, а не детерминированных непосредственно генетически. В книге рассматриваются данные изучения такого вопроса, как клетка может использовать свойства систем для своей защиты от ударов.

Увеличивает ли получение большого количества академических знаний о механизмах противохимической обороны клетки эффективность применяемой в клинике химиотерапии? В настоящее время можно отметить, что наметилась положительная тенденция в формировании ответа на этот вопрос. В клинике из-за огромного объема работы в каждом конкретном случае практически невозможно установить причину резистентности индивида к действию того или иного лекарства. Возможность же анализа только спектра miR, регулирующих активность генов, продукты которых являются мишенями действия назначаемых лекарств, позволяют ускорить процесс подбора для конкретного больного наиболее эффективного лекарства [5]. Более того, если возможность замены мишенного ингибитора «грязным» лекарством, взаимодействующим со многими клеточными структурами [4] также связана с эмпирическим поиском подходящих вариантов такого лекарства, то благодаря становлению системной биологии возникла концепция и возможность идентификации мишеней. Это также ускоряет подбор

эффективных ингибиторов клеточного метаболизма и усиливает их совместное действие [6].

Однако в современной фармакологии основные силы сконцентрированы все-таки на изучении малых химических молекул в качестве ингибиторов тех или иных макромолекул клетки, необходимых для осуществления того или иного ее молекулярного процесса. Таким образом, внимание сосредоточивается на возможности получения лекарства мишенного типа действия. До недавнего времени на фармацевтическом рынке циркулировало порядка 500 мишенных лекарств [7] и прогнозируется очень быстрое увеличение этого числа [8, 9]. Это объясняется возможностями новой технологии, которая получила название молекулярного докинга. Докинг — это выявляемое с помощью компьютера пространственное соответствие между каким-то участком структуры данного рецептора и низкомолекулярным лигандом, который, встраиваясь в этот участок, выводит рецептор из строя. Развитию этой технологии способствовали методы клонирования отдельных генетических последовательностей генома организма, получение в больших количествах продукта клонированной последовательности при использовании сверхэкспрессионных векторов и специальных клеток. Это облегчало возможность получения кристаллической формы изучаемого продукта. Рентгенологическое исследование полученного кристалла такого продукта, изучаемого в качестве мишени, позволяет устанавливать положение всех звеньев молекулы относительно друг друга, т. е. устанавливать его трехмерную, 3D-структуру. Ее визуализация на экране компьютера и техника расчетов расстояний и углов между звеньями создает поле деятельности для работы по поиску ингибиторного лиганда, по докингу.

Отметим также, что в современной фармакологии в связи со сложностями проблемы хемоустойчивости к малым молекулам сложился также альтернативный путь поиска лекарств, представленных не малыми химическими молекулами, а макромолекулами в виде ферментов, антител, различных белков и пептидов. (В настоящее время функционирует даже специальный термин — биотерапия — *biotherapy*.) Для характеристики такого подхода приведем один пример. При лейкемии оказалось, что злокачественные клетки требуют большие количества аспарагина по сравнению с нормальными клетками. Введение же в кровь фермента *L*-аспарагиназы приводило к резкому снижению содержания этой аминокислоты для организма, и это позволяло останавливать рост злокачественных клеток [10]. Избегая последствий активации механизмов, работающих на субстратах, представленных малыми молекулами, макромолекулярные

лекарства требуют решения других проблем: внутриклеточной доставки и их иммуногенности. При решении первой проблемы изучение сосредоточивается на наносредствах, способности клетки к эндоцитозу и возможностью управления поведением образующихся эндосом, а также наличием в используемой макромолекуле специального РТD-домена — *protein transduction domain*. Оказалось, что этот домен определяет возможность проникновения молекулы белков и пептидов через клеточную мембрану [11–14]. Что касается второй проблемы, то также оказалось, что конъюгирование белков с полиэтиленгликолем (технология, называемая пэгилированием), позволяет изменять фармакокинетические свойства макромолекулярных лекарств, включая время жизни таких белков в клетке и их иммуногенные свойства [15–17].

Цель данной книги состояла в раскрытии молекулярных защитных механизмов отдельной клетки, обеспечивающих жизнеспособность на уровне отдельной клетки. Однако в последнее время большое внимание привлекают механизмы многоклеточного уровня возникновения лекарственной устойчивости опухолей (*tumor drug resistance* — TDR). Они определяются возможностями межклеточных взаимодействий и особенностями влияния микроокружения опухоли в организме, от которых зависит снабжение опухоли кровеносными сосудами, связь с внеклеточным матриксом и экранирование опухоли клетками соединительной ткани. Этим механизмам посвящен обзор [18]. В настоящее время данные о возможности такого межклеточного взаимодействия со злокачественной клеткой составляют основу формирующейся в онкологии новой концепции о влиянии здоровых клеток на раковую клетку, спасающих ее от терапевтических ударов, что получило специальное название EMDR (*environment-mediated drug resistance*) [19]. Ясно, что эта концепция обладает потенциалом изменения фокуса химиотерапии в клинике с раковой клетки на ее здоровое окружение и порождает надежду на повышение эффективности терапии. TDR и EMDR — это тема для специального рассмотрения.

Отметим также, что в настоящее время трудности, встречаемые на пути химиотерапии в клинике, заставляют обращать внимание и на различные альтернативные средства лечения рака. Недавно средства массовой информации сообщили об успехах австралийских клиницистов, разработавших новую технологию борьбы с опухолями с помощью рентгеновского облучения. Итак, проблема, описанная в данной книге, движется по пути возможных решений и ясно, что дорогу осилит идущий.

SUMMARY

The book summarizes the main molecular mechanisms studied that can defend cell against outer assaults and determine cell chemoresistance emergence. They make up special groups depending on the possibility of alterations in different biomolecules involved into the fulfillment of cell various processes. These concern the small chemical molecules transportation and distribution inside the cell, their modification or degradation, their interaction with the target biomolecule under different conditions and cell response to the stress resulting in enhancing molecular activations and reparations as well as disobeying to the inherent cell death program. The special emphasis is made on the possibility of clogging the process of substance distribution inside the cell. This could result from changes in proteins folding and their overcrowding in the cell. Development of miR technologies to control the level of genes expression, technologies of epigenetic modifications control and nanotechnologies is the search way to obtaining results of clinical values. Rising of systems biology ideology shows the significance of the conception of co-targets using to override cell defense mechanisms, to overcome chemoresistance and to make chemotherapy effective.

The book is a snapshot of different areas of research on drug resistance and is written in a comprehensive format useful for undergraduate and graduate students and everyone entering this field.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

К введению

1. *Holden C.* Stalking a killer in Russian prisons // *Science*. — 1999. — **286**, N 5445. — P. 1670.
2. *Vassal A., Chechukin Y., Raykhert I. et al.* Reforming tuberculosis control in Ukraine: results of pilot projects and implications for the national scale-up of DOTS. Doi: 10.1093/heapol/czn045.
3. *Khan K., Jun Wang, Wei Hu. et al.* Tuberculosis infection in the United States // *Amer. J. Respir. and Crit. Care Medicine*. — 2008. — **177**. — P. 455–460.
4. *Schluger N.W.* Tuberculosis drug resistance in Europe: sunny days but clouds on the horizon // *Eur. Respir. J.* — 2007. — **30**. — P. 825–827.
5. *Bernal J.* Origin of Life. — London: Weidenfeld & Nicolson, 1967. — 345 p.
6. *Pearson H.* What is a gene? // *Nature*. — 2006. — **441**. — P. 399–401.
7. *Lilley D.* RNA catalysts. // *Biochemist*. — 2006. — **28**, N 2. — P. 7–10.
8. *Kim J.* Riboswitches. // *Ibid.* — P. 11–15.
9. *Rentmeister A., Famulok M.* Gripping stuff // *Ibid.* — P. 17–20.
10. *Strobel S.* Intron splicing. // *Ibid.* — P. 21–24.
11. *Isaacs F.J., Dwyer D.J., Collins J.J.* RNA synthetic biology // *Nature biotechnol.* — 2006. — **24**, N 5. — P. 545–554.
12. *Woese C.* The genetic code. — New York, 1967. — P. 179–195.
13. *Crick F.* The origin of the genetic code // *J. Mol. Biol.* — 1968. — **38**. — P. 367–379.
14. *Breaker R.R.* RNA world. — 3-rd ed. — New York: Cold Spring Harb. Press, 2006.
15. *Ширина Т.В., Бобровская М.Т., Козлов Э.А.* МикроРНК: от фундаментальных исследований до их приложений // *Биополе и клетка*. — 2007. — **23**, № 6. — С. 467–482.
16. *Breaker R.R.* Making catalytic DNAs // *Science*. — 2000. — **290**.
17. *Kitano H.* Systems biology: a brief overview // *Science*. — 2002. — **295**. — P. 1662–1664.
18. *Dimarq A., Hunneyball I.* Pharma-entomology: when bugs become drug // *Drug Discover. Today*. — 2003. — **8**, N 3. — P. 107–110.
19. *Ksiazek T.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome // *New Engl. J. Med.* — 2003. — **348**. — P. 1953–1966.
20. *Bloom B.R.* Lessons from SARS // *Science*. — 2003. — **300**. — P. 701.
21. *Одинец К.О., Корнелюк О.І.* Молекулярні аспекти будови і експресії генному коронавірусу SARS // *Біополімери і клітина*. — 2003. — **19**, № 5. — С. 414–431.
22. *Fleming D.* Influenza pandemics and avian flu // *British Med. J.* — 2005. — **331**. — P. 1066–1069.

23. Бернал Дж. Наука в истории общества. — М.: Изд-во иностр. лит., 1956. — 743 с.
24. Zubay G. Agents of bioterrorism: Pathogens and their weaponization. — New York: Columbia Univ. press, 2005. — 376 p.
25. Levy S.B. The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying miracle. — New York: Plenum press, 1992. — 279 p.
26. Power E. Impact of antibiotic restrictions: the pharmaceutical perspectives // Clin. Microbiol. & Infection. — 2006. — **35**, N 5. — P. 25–34.
27. Stocks M. Intrabodies: production and promise // Drug Discover. Today. — 2004. — **9**, N 22. — P. 960–966.
28. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E. Microbial biofilms // Ann. Rev. Microbiol. — 1995. — N 9. — P. 711–745.
29. Старокадомский П.Л. Белковый сплайсинг // Молекуляр. биология. — 2007. — **41**, № 2. — С. 314–330.
30. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биол. химии. — 2004. — **44**. — С. 269–306.
31. Warner S. Diagnostics + Therapy = Theranostics. Strategy requires teamwork, partnering, and tricky regulatory maneuvering // The Scientist. — 2004. — **18**, N 16. — P. 38.
32. Fire A., Xu S., Montgomery H. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. — 1998. — **391**. — P. 806–811.
33. Sharp P.A. RNA interference // Genes & Dev. — 2001. — **15**. — P. 485–489.
34. Kültz D. Evolution of the cellular proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function // J. Exp. Biol. — 2003. — **206**. — P. 3119–3124.
35. Cherepenko Y., Hovorun D. Bacterial multidrug resistance unrelated to multidrug exporters: cell biology insight // Cell Biol. Intern. — 2005. — **29**, N 1. — P. 3–7.
36. Шуман В. Мир камня. Драгоценные и поделочные камни. — М.: Мир, 1986. — 262 с.

К главе 1

1. Luria S.E., Delbruck M. Mutations of bacteria from virus sensitive to virus resistance // Genetics. — 1943. — **28**, N 6. — P. 491–511.
2. Кудлай Д.Г., Чубуков В.Ф., Оганесян М. Генетика лекарственной устойчивости бактерий. — М.: Медицина, 1972. — 255 с.
3. Bacterial resistance to antimicrobials. — New York; Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. — 495 p.

К главе 2

1. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E. et al. Microbial biofilms // Annu Rev. Microbiol. — 1995. — **49**. — P. 711–745.
2. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux // Science. — 1994. — **264**. — P. 382–388.
3. Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacteria outer membrane // J. Biol. Chem. — 1994. — **269**. — P. 3505–3508.
4. Arkin I.A., Brunger A., Engelman D. Are there dominant membrane protein families with a given number of helices? // Proteins: Structure Function Genet. — 1997. — **281**, N 4. — P. 465–466.

5. *Jennigs M.* Topography of membrane proteins // *Ann. Rev. Biochem.* — 1989. — **58**. — P. 999—1027.
6. *Prinz W.J., Beckwith J.* Gene fusion analysis of membrane proteins topology: a direct comparison of alkaline phosphatases and β -lactamase fusion // *J. Bacteriol.* — 1994. — **176**. — P. 6410—6413.
7. *Ames G.F.L.* Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanisms and evolution // *Ann. Rev. Biochem.* — 1986. — **55**. — P. 397—425.
8. *Holland I.B., Blight M.A.* ABC-ATPases, adaptable energy generators fueling transmembrane movement of a variety of molecules in organization from bacteria to humans // *J. Mol. Biol.* — 1999. — **293**. — P. 381—389.
9. *Higgins C.* Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters // *Nature*. — 2007. — **446**. — P. 749—757.
10. *Paulsen I., Brown M., Skurray R.* Proton-dependent multidrug efflux systems // *Microbiol. Rev.* — 1996. — **60**. — P. 575—608.
11. *Pao S., Paulsen I., Saier V.* Major facilitator family // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 1998. — **9**. — P. 263—269.
12. *Taber H.* Antibiotic permeability // *Bacterial resistance to antimicrobials* / Ed. by K. Lewis. — New York; Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. — P. 193—208.
13. *Hediger M., Romero M., Ji-Bin Peng et al.* The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins // *Eur. J. Physiol.* — 2004. — **447**. — P. 465—468.
14. *Ставровская А.А.* Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // *Биохимия*. — 2000. — **65**. — P. 112—125.
15. *Martin C., Berridge G., Mistry P. et al.* Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis // *Biochemistry*. — 2000. — **39**. — P. 11 901—11 906.
16. *Szakacs G., Ozvegy C., Bakos E. et al.* Role of glycine-534 and glycine-1179 of human multidrug resistance protein (MDR1) in drug-mediated control of ATP hydrolysis // *Biochem. J.* — 2001. — **356**. — P. 71—76.
17. *Urbatsch I., Gimi K., Wilke-Mounts S., Senior A.* Investigation of the role of glutamate-471 and glutamate-1114 in the two catalytic sites of P-glycoprotein // *Biochemistry*. — 2000. — **39**. — P. 11921—11927.
18. *Urbatsch I., Julien M., Carrier I. et al.* Mutational analysis of conserved carboxylate residues 1994 in the nucleotide binding sites of P-glycoprotein // *Ibid.* — P. 14 138—14 149.
19. *Urbatsch I., Tyndall G., Tombine G.* Senio P-glycoprotein catalytic mechanisms // *J. Biol. Chem.* — 2003. — **278**, N 25. — P. 23171—23179.
20. *Костенко Е.В., Бибилашвили Р.Ш., Власов В.В., Зенкова М.А.* Вторичная структура 5'-концевого фрагмента мРНК гена множественной лекарственной устойчивости человека // *Молекуляр. биология*. — 2000. — **34**. — С. 67—78.
21. *Sekino T.N., Watanabe M., Hosoyamada Kanai Y., Endou H.* Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter // *J. Biol. Chem.* — 1997. — **272**, N 30. — P. 18 526—18 529.
22. *Davies J.F., Chen Ioannou Y.* Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein // *Science*. — 2000. — **290**. — P. 2295—2298.

23. Orlov Yu., Kazbekov E.N. Structural investigation of the organic anion transport system of the rat kidney brush border membrane by the affinity probe method // *Membrane & Cell Biol.* — 1996. — **10**. — P. 421–428.
24. Bassler B.L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing // *Curr. Opin. Microbiol.* — 1999. — N 2. — P. 582–587.
25. Bassler B.L. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria // *Cell.* — 2002. — **109**. — P. 421–424.
26. Zhu J., Miller M., Vance R. et al. Quorum sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholera* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2002. — **99**. — P. 3129–3134.
27. Miller M., Skorupski K., Derrick H. et al. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholera* // *Cell.* — 2002. — **11**. — P. 303–314.
28. Edgar R., Bibi E. Mdf A, an *Escherichia coli* multidrug protein with an extraordinary broad spectrum of drug recognition // *J. Bacteriol.* — 1997. — **179**. — P. 2274–2280.
29. Sugiuro T., Kato Y., Tsui A. Role of SLC xenobiotic transporters and their regulatory mechanisms PDZ proteins in drug delivery and disposition // *J. Control. Release.* — 2006. — **116**, N 2. — P. 238–246.
30. Hayes J., Wolf C.R. Molecular mechanisms of drug resistance // *Biochem. J.* — 1990. — **272**. — P. 281–285.
31. Kotra L., Samama J., Mobashery S. β -lactamases and resistance to β -lactam antibiotics // *Bacterial resistance to antimicrobials* / Eds K. Lewis et al. — New York; Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. — P. 123–160.
32. Wright G. Mechanisms of aminoglycoside antibiotic resistance // *Bacterial resistance to antimicrobials* / Ed. by K. Lewis. — New York; Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. — P. 91–122.
33. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes // *Science.* — 1994. — **264**. — P. 375–382.
34. Cruz F., Garcia-Lobo J., Davies J. Antibiotic resistance: how bacterial populations respond to a simple evolutionary force // *Bacterial resistance to antimicrobials* / Eds K. Lewis et al. — New York; Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. — P. 19–36.
35. Kertesz M.A., Elgorriaga A., Amrhein N. Evidence for two distinct phosphonate-degrading enzymes (C-P lyases) in *Arthrobacter* sp. GLP-1 // *Biodegradation.* — 1991. — **2**. — P. 53–59.
36. Baez S., Segura-Aguilar J., Widesten M. et al. Glutathione transferase catalyse the detoxication of oxidized metabolites o-quinones of catecholamines and may serve as an antioxidizing system preventing degenerative cellular processes // *Biochem. J.* — 1997. — **324**. — P. 25–28.
37. Danielson P. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans // *Curr. Drug. Metabol.* — 2002. — **3**, N 6. — P. 561–597.
38. Krizkova S., Fabrik I., Adam V. et al. Metallothionein-a promising tool for cancer diagnostics // *Bratisl. Lek. Listy.* — 2009. — **110**, N 2. — S. 93–97.
39. Tsuga H., Kameyama K., Haga T. et al. Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes // *J. Biol. Chem.* — 1994. — **269**. — P. 32 522–32 527.

40. Ghosh R., Chen Y.-T., De Biasio K. et al. Cell-based, high content screen for receptor internalizations, recycling and intracellular trafficking // *Biotechniques*. — 2000. — **29**. — P. 1760—1765.
41. Pishvae B., Payne G.S. Clathrin coats-threads laid bare // *Cell*. — 1998. — **95**. — P. 443—446.
42. Andersen R., Kamen B., Rothberg K., Lacey S. Protocytosis: Sequestration and transport of small molecules by caveole // *Science*. — 1992. — **255**. — P. 410—411.
43. Hoerl B., Scott R. Plasma membrane vesiculation: A cellular response to injury // *Virchov Arch. B. Cell path.* — 1978. — **22**. — P. 335—345.
44. Nielands B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds // *J. Biol. Chem.* — 1995. — **270**. — P. 26 782—26 785.
45. Winkelmann G., Drechsel H. *Biotechnology*. — 2nd ed. — Chapter 5: Microbial Siderophores. — Wiley-VCH Verlag Gmb H., Weinheim Germany, 1997. — Vol. 7. — P. 199—246.
46. Sikorski P., Gruys K. Understanding glyphosate's molecular mode of action with 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase: evidence favoring an allosteric inhibitor model // *Accounts Chem. Res.* — 1997. — **30**. — P. 2—8.
47. Kishore G., Shah D. Aminoacid biosynthesis inhibitors as herbicides // *Ann. Rev. Biochem.* — 1988. — **57**. — P. 627—663.
48. Padgett S.R., Re D.B., Barry G.F. et al. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup ready™ gene // *Herbicide-Resistant Crops* / Ed. by S. Duke. — Boca Raton, FL: CRC Lewis Publ., 1996.
49. Amrhein N., Deus B., Gehrke P., Steinrücken H. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro // *Plant Physiol.* — 1980. — **66**, N 5. — P. 830—834.
50. Steinrücken 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**, N 4. — P. 1207—1212.
51. Spratt J. Resistance to antibiotics mediated by target alterations // *Science*. — 1994. — **264**. — P. 388—392.
52. Sideraki V., Huang W., Paltzki T., Gilbert H. A secondary drug resistance mutation of TEM-1 β -lactamase that suppresses misfolding and aggregation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2001. — **98**. — P. 283—288.
53. Hooper D. Target modification as a mechanism of antimicrobial resistance // *Bacterial resistance to antimicrobials* / Eds K. Lewis et al. — New York; Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. — P. 161—192.
54. Smart C., Jöhanning D., Müller G., Amrhein N. Selective overproduction of 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate // *J. Biol. Chem.* — 1985. — **260**, N 30.— P. 16338—16346.
55. Holländer H., Jöhanning D., Meyer H., Amrhein N. Molecular basis for the production of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant cell suspension culture of *Corydalis sempervirens* // *Plant Mol. Biol.* — 1988. — **11**. — P. 215—220.
56. Черепенко Е.И. Амплификация генов и гербицидоустойчивость растений // *Биополимеры и клетка*. — 1993. — **9**, № 3. — С. 3—16.

57. *Neuhard J., Nygaard P.* Purines and pyrimidines // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology / Eds F. Neidhardt et al. — Washington DC: ASM Press, 1987. — Vol. 1. — P. 445—473.
58. *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.
59. *Craig S.* Purine salvage enzymes as targets for the chemotherapeutic treatment of parasitic diseases // *Биополимеры и клетка.* — 1994. — **6**. — С. 65—71.
60. *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 // *Там же.* — 1997. — **19**. — С. 403—407.
61. *Cashel M., Rudd K.* The stringent response // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology / Eds F. Neidhardt et al. — Washington DC: ASM Press, 1996. — Vol. 2. — P. 1470—1538.
62. *Белицкий Б.П., Кулакаускас С.Т., Суходолец В.В. и др.* Точное картирование гена *gpp*, участвующего в синтезе гуанозинтетрафосфата, и получение делеции *ilvC-gpp* области хромосомы *Escherichia coli* // *Генетика.* — 1986. — **22**, № 12. — С. 2775—2783.
63. *Viswanathan A., Lanjuin S.* Lovett identification of RNaseT as a highcopy suppressor of the UV sensitivity associated with single-strand DNA exonuclease deficiency in *Escherichia coli* // *Genetics.* — 1999. — **151**. — P. 929—934.
64. *Сидоренко С.В., Тишков В.И.* Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // *Успехи биол. химии.* — 2004. — **44**. — С. 263—306.
65. *Xiang-Qin-Liu.* Protein splicing Intein: Genetic mobility, origin and evolution // *Ann. Rev. Genet.* — 2000. — **34**. — P. 61—76.
66. *Noren C., Wang J., Perler F.* Dissecting the chemistry of protein splicing and its application // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2000. — **39**. — P. 450—461.
67. *Paulus H.* Inteins as targets for potential antimycobacterial drugs // *Frontiers in Biosci.* — 2003. — **8S**. — P. 1157—1165.
68. *Старокадомский П.Л.* Белковый сплайсинг // *Укр. биохим. журн.* — 2005. — **77**. — С. 14—29.
69. *Старокадомский П.Л.* Белковый сплайсинг // *Молекуляр. биология.* — 2007. — **41**, № 2. — С. 314—330.
70. *Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // *Science.* — 1999. — **284**. — P. 1318—1322.
71. *O'Toole G.S., Pratt L.A., Watnick P. et al.* Genetic approaches to study biofilms // *Methods Enzymol.* — 1999. — **310**. — P. 91—109.
72. *Pratt L.A., Kolter R.* Genetic analysis of bacterial biofilms formation // *Curr. Opin. Microbiol.* — 1999. — N 2. — P. 598—603.
73. *Konopka K., Goslinski T.* Photodynamic therapy in dentistry // *J. Dent. Res.* — 2007. — **86**, N 8. — P. 694—707.
74. *Lewis K.* Programmed death in bacteria // *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* — 2000. — **64**. — P. 503—514.
75. *Zhang L., Thien-Fah Mah.* Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics // *J. Bacteriol.* — 2008. — **190**, N 13. — P. 4447—4452.
76. *Loehfelm T., Campagnari A.* Identification and characterization of *Acinobacter baumannii* biofilm-associated protein // *Ibid.* — P. 1036—1044.

77. Choi A., Slamti L., Fikry Y. et al. The *pgaABCD* locus of *Acinebacter baumannii* encodes the production of poly-β-1-6-N- acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation // Ibid. — 2009. — **191**, N 19. — P. 5953—5963.
78. Lee J., Maeda T., Hoon Hong S., Wood T. Reconfiguring the quorum — sensing regulator SdiA of *Escherichia coli* to control biofilm formation via indole and N-acetylhomoserine lactones // Appl. Environ. Microbiol. — 2009. — doi: 10.1128/AEM.02081-08.
79. Isano A., Amarante M., Kher W., Kaplan B. Differential role of Poly-N-acetylglucosamine surface polycaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis* biofilms // Ibid. — 2008. — **74**, N 2. — P. 470—476.
80. Harrison J., Ceri H., Yerly J. et al. Metal ions may suppress or enhance cellular differentiation in *Candida tropicalis* biofilms // Appl. Environ. Microbiol. — 2007. — **73**, N 15. — P. 4940—4949.
81. Perumal P., Mekala S., Chaffin W. Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. — Antimicrob Agents Chemotherapy, 2007. — **51**, N 7. — P. 2454—2463.
82. Yeater K., Chandra J., Cheng G. et al. Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development // Microbiology. — 2007. — **153**. — P. 2373—2385.
83. Lu T., Collins J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2007. — **104**, N 2. — P. 11197—11202.
84. Lewis K., Lomovskaya O. Drug efflux // Bacterial resistance to antimicrobials. — New York; Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. — P. 61—90.
85. Jasin M., Regan L., Schimmel P. Dispensable pieces of an aminoacyl tRNA synthetase which activate the catalytic site // Cell. — 1984. — **36**. — P. 1089—1095.

К главе 3

1. McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge // Science. — 1984. — **226**. — P. 792—800.
2. Hayes J., Wolf C.R. Molecular mechanisms of drug resistance // Biochem. J. — 1990. — **272**. — P. 281—285.
3. Walker G. SOS-regulated proteins in translesion DNA synthesis and mutagenesis // Trends Biochem. Sci. — 1995. — **20**. — P. 416—420.
4. Smith B., Walker G.H. Mutagenesis and More: *umuDC* and the *Escherichia coli* SOS response // Genetics. — 1998. — **148**. — P. 1599—1610.
5. Sampson L., Cairns J. A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli* // Nature. — 1977. — **267**. — P. 281—283.
6. Cristman M.F., Morgan R.W., Jacobson F.S., Ames B.N. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium* // Cell. — 1985. — **41**, N 3. — P. 753—762.
7. Storz G., Tartaglia L., Ames B.N. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: Direct activation by oxidation // Science. — 1990. — **248**. — P. 189—194.
8. Demple B. Regulation of bacterial oxidative stress genes // Ann. Rev. Genet. — 1991. — **25**. — P. 315—337.
9. Burdon R. Heat shock and heat shock proteins // Biochem. J. — 1986. — **240**. — P. 313—324.

10. Miller P., Rather P. Global response systems that cause resistance // Bacterial resistance to antimicrobials / Eds K. Lewis et al. — New York; Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. — P. 37—60.
11. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology / Eds F. Neidhardt et al. — Washington DC: ASM Press, 1987. — Vol. 1. — P. 445—473.
12. Alekshun M.N., Levy S. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon // Antimicrob. Agents Chemother. — 1997. — **10**. — P. 2067—2075.
13. George A.M., Levy S.B. Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics // J. Bacteriol. — 1983. — **155**. — P. 541—548.
14. Hächler H., Cohen S.P., Levy S. *mar* A, regulated locus which control expression of chromosomal multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1991. — **173**. — P. 5532—5538.
15. Cohen S.P., Huchler Y., Levy S.B. et al. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar* locus in *Escherichia coli*) // J. Bacteriol. — 1993. — **175**. — P. 1484—1492.
16. Sulavik M.C., Gambino L.F., Miller P.F. Analysis of the genetic requirements for inducible multiple-antibiotic resistance associated with the *mar* locus in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1994. — **176**. — P. 7754—7756.
17. Martin R.G., Nyantaki P.S., Rosner J.L. Regulation of the multiple antibiotic resistance (*mar*) regulon by *marORA* operator sequences in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1995. — **177**. — P. 4176—4178.
18. Martin R., Rosner J. Fis, an accessorial factor for transcriptional activation of the *mar* promoter of *Escherichia coli* // Bacteriology. — 1997. — **179**, N 23. — P. 7410—7419.
19. Gallegos M.T., Schleif R., Bairoch A. et al. AraC/XylS family of transcriptional regulators // Mol. Microbiol. — 1997. — **63**. — P. 393—410.
20. Morel Y., Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress // Biochem J. — 1999. — **342**. — P. 481—496.
21. Wu J., Weiss B. Two divergently transcribed genes *sox R* and *sox S*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1991. — **73**. — P. 2864—2871.
22. Berlyn M. Linkage map of *Escherichia coli* K-12. Edition 10: The traditional map // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1998. — **62**, N 3. — P. 814—984.
23. Skarstad K., Thony B., Hwang D.S. et al. A novel binding protein of the origin of the *Escherichia coli* chromosome // J. Biol. Chem. — 1993. — **268**. — P. 5365—5370.
24. Jair K.-W., Martin R.G., Rosner J.L. et al. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters // J. Bacteriol. — 1995. — **177**. — P. 7100—7104.
25. Martin R.G., Gillette W.K., Rhee S., Rosner J.L. Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter // Mol. Microbiol. — 1999. — **34**. — P. 431—441.

26. *Martin R., Rosner J.L.* Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (*marR*) to *mar* operator sequence // Proc. Nat. Acad. Sci USA. — 1995. — **92**, N 12. — P. 5456—5460.
27. *Miller P.F., Sulavik M., Gambino L., Darer M.* Roles of *marR AB* and *soxRS* regulators in protecting *Escherichia coli* from plant-derived phenolic agents // 96th Gen. Meet. Amer. Soc. Microbiol., New Orleans, May 19—23, 1996.
28. *Sulavic M.C., Gambino L.F., Miller P.F.* The *Mar* repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*: prototypic member of a family of bacterial regulatory proteins involved in sensing phenolic compounds // Mol. Medicine. — 1995. — **1**. — P. 436—446.
29. *Cohen S.P., McMerry L.M., Levy S.B.* *mar A* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (*Mar*) mutants of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1988. — **170**. — P. 5416—5422.
30. *Mizuno N., Chou M.-I., Inouye M.* A unique mechanism to regulate gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcripts (micRNA) // Proc. Nat. Acad. Sci USA. — 1984. — **81**. — P. 1966—1970.
31. *Anderson J., Delihis N.* *micF* RNA binds to the 5'nd of *ompF* mRNA and to a protein from *Escherichia coli* // Biochemistry. — 1990. — **29**. — P. 9249—9256.
32. *Nikaido H.* Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria // J. Bacteriol. — 1996. — **1789**, N 20. — P. 5853—5859.
33. *Ma D., Cook D.N., Alberti M. et al.* Genes of *acr A* and *acr B* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. — 1995. — **16**. — P. 45—55.
34. *Paye K.J., Clark A.J.* Characterization of gentamicin 2'-N-acetyltransferase from *Providencia stuartii*: its use of peptidoglycan metabolites for acetylation of both aminoglycosides and peptidoglycan // J. Bacteriol. — 1997. — **179**. — P. 4106—4114.
35. *Rather P.N., Paradise M.R., Parojic M.M.* An extracellular factor regulating expression of the chromosomal aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase in *Providencia stuartii* // Antimicrob. Agents Chemother. — 1997. — **41**. — P. 1749—1754.
36. *Hegi M., Liu L., Herman J. et al.* Correlation of O⁶-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity // J. Clin. Oncol. — 2008. — **26**, N 25. — P. 4189—4199.
37. *Sedgwick B., Libdahl T.* Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage // Oncogene. — 2002. — **21**, N 58. — P. 8886—8894.
38. *Verbeek B., Southgate T., Gilham D., Margison G.* O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy // Brit. Med. Bull. — 2008. — **85**. — P. 17—33.
39. *Roos W., Tsaalbi-Shtylik A., Tsaryk R. et al.* The tranlesion polymerase Rev3L in the tolerance of alkylating anticancer drugs // Molec. Pharmacol. — 2009. — **76**. — P. 927—934.
40. *Bocangel D., Sengupta S., Mitra S., Bhakat K.* p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor // Anticancer Res. — 2009. — **29**. — P. 3741—3750.
41. *Zheng M., Bocangel D., Ramesch R. et al.* Interleukin-24 overcomes temozolomide resistance and enhances cell death by down-regulation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase in human melanoma cells // Mol. Cancer Therapeut. — 2008. — **7**, N 12. — P. 3842—3851.

42. Shen L., Kondo Y., Ahmed S. et al. Drug sensitivity prediction by CpG island methylation profile in the NCI-60 cancer cell line panel // *Cancer Res.* — 2007. — **67**, N 23. — P. 11335—11343.
43. Lahtz C., Pfeifer G. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer // *J. Mol. Cell Biol.* — 2011. — **3**. — P. 51—58.
44. Konduri S., Nicku J., Bobustuc G. et al. Blockade of MGMT expression by O⁶-benzyl guanine Leads to Inhibition of Pancreatic Cancer Growth and Induction of Apoptosis // *Clin. Cancer Res.* — 2009. — **15**, N 19. — P. 6087—6095.
45. Reese J., Roth J., Gerson S. Bone marrow-derived cells exhibiting lung epithelial cell characteristics are enriched in vivo using methylguanine-DNA Methyltransferase-Mediated Drug Resistance // *Stem Cells.* — 2008. — **25**, N 3. — P. 675—681.
46. Milson M. Reciprocal relationship between O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase P140K expression level and chemoprotection of hematopoietic cells // *Cancer Res.* — 2008. — **68**. — P. 6171—6180.

К главе 4

1. Селье Г. От мечты к открытию. — М.: Прогресс, 1987. — 367 с.
2. Barouki R., Sitia R. Cellular stress // *FEBS Lett.* — 2007. — **581**. — P. 3581.
3. Khil P.P., Camerino-Otero R.D. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* — 2002. — **44**. — P. 89—105.
4. Berka R., Cui X., Yanofsky C. Genome-wide transcriptional changes associated with genetic alterations and nutritional supplementation affecting tryptophan metabolism in *Bacillus subtilis* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2003. — **100**, N 10. — P. 5682—5687.
5. Emerson J., Stahler R., Wren B., Fairweather N. Microarray analysis of the transcriptional response in *Clostridium difficile* to environmental and antibiotic stress // *J. Med. Microbiol.* 2001. — **57**. — P. 757—764.
6. McClintock. The significance of responses to the genome to challenge // *Science.* — 1984. — **226**. — P. 792—800.
7. Lewin B. Genes VII. — Oxford: Oxford Univ. Press, 1999. — 505 p.
8. Хесин Р.В. Непостоянство генома. — М.: Наука, 1984. — 472 с.
9. Колотова Т.Ю., Стегний Б.Т., Кучма И.Ю. и др. Механизмы и контроль перестроек генома эукариот. — Харьков: Коллегиум, 2004. — 263 с.
10. Колотова Т.Ю., Волянский А.Ю., Кучма И.Ю. и др. Нестабильность генома и эпигенетическое наследование у эукариот. — Харьков: Око, 2007. — 287 с.
11. Yu X., Gabriel A. Patching broken chromosomes with extracellular DNA // *Mol. Cell.* — 1999. — **4**. — P. 873—881.
12. Brasch K., Ochs R.L. Nuclear bodies (NBs): a newly «rediscovered» organelle // *Exp. Cell Res.* — 1992. — **202**, N 2. — P. 211—223.
13. Підпала О.В., Яцишина А.П., Лукаш Л.Л. Мобільні генетичні елементи геному людини: розподіл і функціональна роль // *Цитология и генетика.* — 2008. — № 6. — С. 63—75.
14. Krishnaswamy L. Transposon biology — A historical perspective // *Curr. Sci.* — 2007. — **93**, N 7. — P. 1021—1024.
15. Kornberg T., Noma C., Ali Z. Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter // *Genes and Develop.* — 1990. — **4**. — P. 1079—1093.

16. *Bennet P.* Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria // *J. Antimicrob. Chemother.* — 1999. — **43**. — P. 1–4.
17. *Ильина Т.* Структурная организация и механизмы перемещений генных кассет, кодирующих резистентность к антибиотикам и факторам вирулентности бактерий // Молекуляр. генетика и микроб. вирусология. — 2001. — **1**. — С. 3–12.
18. *Schmidt H.* Hensel pathogenicity islands in bacterial pathogens // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2004. — **17**. — P. 14–56.
19. *Hall R.M., Stokes H.W.* Integrons or superintegrons? // *Microbiology.* — 2004. — **150**. — P. 1–4.
20. *Ning Jang, Wessler S.* Insertion preference of maize and rice miniature inverted repeat transposable elements as revealed by the analysis of nested elements // *The Plant Cell.* — 2001. — **13**. — P. 2553–2564.
21. *Spradling A.C., Rubin G.H.* Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosome // *Science.* — 1982. — **218**, N 4570. — P. 341–347.
22. *Ambros V.* Dicing Up RNAs // *Science.* — 2001. — **293**, N 5531. — P. 811–813.
23. *Ширина Т.В., Бобровская М.Т., Козлов Э.А.* МикроРНК: от фундаментальных исследований до их приложений // Биополимеры и клетка. — 2007. — **23**, N 6. — С. 467–482.
24. *Schlenke T., Begun D.* Strong selective associated with transposon insertion in *Drosophila simulans* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2004. — **101**, N 6. — P. 1626–1631.
25. *Mhiri C., Morel J.B., Vernhettes S. et al.* The promoter of tobacco Tnt1-retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress // *Plant Mol. Biol.* — 1997. — **33**, N 2. — P. 257–266.
26. *Grandbastien M.A., Auden C., Bonnivaard E. et al.* Stress activation of genomic impact on Tnt1 retrotransposon in *Solanaceae* // *Cytogen. and Genome Res.* — 2005. — **110**, N 1–4. — P. 229–241.
27. *Duesberg P.* Does aneuploidy or mutation start cancer? // *Science*— 2005. — **307**, N 5706. — P. 41–42.
28. *Duesberg P.* Chromosomal chaos and cancer // *Scientific American.* — 2007. — **296**, May. — P. 52–59.
29. *Duesberg P., Li R., Fabarius A., Hehlmann R.* The chromosomal basis of cancer // *Cell Oncol.* — 2005. — **27**, N 5–6. — P. 293–318.
30. *Duesberg P., Li R., Sachs R. et al.* Cancer drug resistance: the central role of the karyotype // *Drug Resistance Updates.* — 2007. — **10**. — P. 51–58.
31. *Li R., Hehlmann R., Sachs R., Duesberg P.* Chromosomal alterations cause the high rate and wide ranges of drug resistance in cancer cells // *Cancer Genet& Cytogenet.* — 2005. — **163**, N 1. — P. 44–56.
32. *Duesberg P., Fabarius A., Hehlmann R.* Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cell // *IUMB Life.* — 2004. — **56**. — P. 65–81.
33. *Maser R., DePinho R.* Connecting chromosomes Crisis and cancer // *Science.* — 2002. — **297**. — P. 565–569.
34. *Leach N., Rende C., Jensen K. et al.* Human chromosomes with shorter telomeres and large heterochromatin region have a higher frequency of acquired somatic cell aneuploidy // *Mech. Aging Develop.* — 2004. — **125**. — P. 563–573.

35. *Pellman D.* Aneuploidy and cancer // *Nature*. — 2007. — **446**. — P. 38–39.
36. *Matsuoka A., Matsuura K., Sakamoto H. et al.* A proposal for a simple way to distinguish aneuploids from clastogens in the in vitro micronucleus test // *Mutagenesis*. — 1999. — **114**, N 4. — P. 385–389.
37. *Epstein C.* The consequences of chromosome imbalance. Principles, Mechanisms and Models. — Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1986. — 520 p.
38. *Iarmarervai G., Botta A., Orsiene T.* Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy // *Toxicol. lett.* — 2006. — **166**, N 1. — P. 1–10.
39. *Черепенко Е.И., Куриленко И. Князева М.В.* Наука о жизни: от молекул к молекулярным машинам // *Укр. биохим. журн.* — 2007. — **79**, № 6. — С. 118–121.
40. *Lee M., Vasiukhin V.* Cell polarity and cancer — cell and tissue polarity as noncanonical tumor suppressor // *J. Cell Sci.* — 2008. — **121**. — P. 1141–1150.
41. *Kops G., Weaver B., Cleveland D.* On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint // *Nature Rev. Cancer*. — 2005. — **5**. — P. 773–785.
42. *Richardson A., Kaye S.* Drug resistance in ovarian cancer: the emerging importance of gene transcription and spatio-temporal regulation of resistance // *Drug Resist. Update*. — 2005. — **8**, N 5. — P. 1–321.
43. *Costerton J., Lewandowski Z., Caldwell D.E. et al.* Microbial biofilms // *Ann. Rev. Microbiol.* — 1995. — P. 711–745.
44. *Boucher Y., Labbate M., Koenig J., Stokes H.* Integrins: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria // *Trends in Microbiol.* — 2007. — **15**, N 7. — P. 301–309.

К главе 5

1. *Schreiber S.* Small molecules: the missing link in the central dogma // *Nat. Chem. Biol.* — 2005. — **1**, N 2. — P. 64–66.
2. *Camilli A., Bassler B.* Bacterial small molecules signaling pathway // *Science*. — 2006. — **311**, N 5764. — P. 1113–1116.
3. *Hogan D.* Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi // *Eukar. Cell*. — 2006. — **5**. — P. 613–614.
4. *Yim Wai, Davis R.* Antibiotics as signalling molecules // *Phyl. Trans. Royal Soc.* — 2007. — **362**. — P. 1195–1200.
5. *Manning G., White D., Martinez R. et al.* The protein kinase complement of the human genome // *Science*. — 2002. — **298**. — P. 1912–1934.
6. *Ingo P., Korndorfer I., Schlehuber S., Skerra A.* Structural mechanism of specific ligand recognition by a lipocalin tailored for the complexation of digoxigenin. — *OJ // Mol. Biol.* — 2003. — **330**. — P. 385–396.
7. *Wen Xie, Uppal H., Saini S. et al.* Orphan nuclear receptor-mediated xenobiotic regulation in drug metabolism // *Drug Discov. Today*. — 2004. — **10**. — P. 442–449.
8. *Barouki R., Coumoul X., Fernandez-Salguero P.* The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein // *FEBS Lett.* — 2007. — **581**. — P. 3608–3615.
9. *Welch W.* How cells respond to stress // *Sci. Amer.* — 1993. — May. — P. 56–64.
10. *Roux P., Blenis J.* ERK and p38-activated protein kinases with diverse biological functions // *Micribiol. Mol. Biol. Rev.* — 2004. — **68**, N 2. — P. 320–344.

11. Gout I., Minami T., Hara K. et al. Molecular cloning and characterization of a novel p70 S6 kinase, p70S6 kinase beta containing a proline-rich region // J. Biol. Chem. — 1998. — **273**, N 46. — P. 30061—30064.
12. Thomson S., Mahadevan L.C., Clayton A. MAP-kinase-mediated signaling to nucleosomes and immediate early gene induction // Semin. Cell Devel. — 1999. — **10**, N 2. — P. 205—211.
13. Maitra S., Chou C.F., Lubber C. et al. The AU-rich element mRNA decay-promoting activity of BRF1 is regulated by mitogen-activated protein kinase 2 // RNA. — 2008. — **14**, N 5. — P. 950—959.
14. Nadeau S., Landry J. Mechanisms of activation and regulation of the heat shock-sensitive signaling pathway // Adv. Exp. Med. Biol. — 2007. — **594**. — P. 100—113.
15. Gerik K.J., Bhimoreddy S.R., Ryerse J.S. et al. Protein kinase C1 (PKC1) is essential for protection against both oxidative and nitrosative stress, cell integrity and normal manifestation of virulence factors in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* // Eukaryotic Cell. — 2008. — Publ. ahead PMID 186815526 [PubMed].
16. Cowen L., Steinbach W. Stress, drugs and evolution. The role of cellular signaling in fungal drug resistance // Ibid. — 2008. — **7**, N 5. — P. 747—764.
17. Dorion S., Landry J. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by heat shock // Cell Stress and Chaperons. — 2002. — **7**, N 2. — P. 200—206.
18. Bakkenist C., Kastan M. Initiating cellular stress responses // Cell. — 2004. — **118**, N 1. — P. 9—17.
19. Sarbassov D., Ali D., Sabatini D. Growing role for the mTOR pathway // Curr. Opin. In Cell Biol. — 2005. — **17**. — P. 596—603.
20. Richardson C., Schalm S., Blenis J. PI3 kinase band TOR PICTORing cell growth // Semin. Cell Devel. — 2004. — **15**, N 2. — P. 147—159.
21. Soon Y., Fang Y., Yoon M. et al. Phospholipase D1 is an effector // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2008. — **105**, N 24. — P. 8286—8291.
22. Rohde J., Yeitman J., Cardenas M.E. The TOR kinase links the nutrient sensing to cell growth // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**, N 13. — P. 9583—9586.
23. Dennis P.B., Jaeschke A., Saitoh M. et al. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor // Science. — 2001. — **294**, N 5544. — P. 1102—1105.
24. Ali S., Sabatini D. Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor mTOR or rictor mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site // J. Biol. Chem. — 2005. — **280**, N 20. — P. 19445—19448.
25. Liu X., Zheng X.F. Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin // Mol. Biol. — 2007. — **18**. — P. 1073—1082.
26. Rosner M., Hengstschlager M. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 component rictor and sin1 // Hum. Mol. Genet. — 2008. — **17**, N 19. — P. 2934—2948.
27. Eastman A. Survival factors intracellular signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis // Semin. Cancer Biol. — 1995. — **6**. — P. 45—52.
28. Downward J. PI3-kinase, Akt and cell survival // Semin. Cell. Develop. Biol. — 2004. — **5**, N 2. — P. 177—182.

29. Horowitz J., Lee D., Waghay M. et al. Activation of the pro-survival PI3K/Akt pathway by TGF-beta 1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor // J. Biol. Chem. — 2004. — **279**, N 2. — P. 1359—1362.
30. Zemskova M., Sahakian E., Bashkirova S., Lilly M. The PIM1 kinase is a critical component of a survival pathway activated by doxorubicin and promotes survival of doxorubicin-treated prostate cancer cells // J. Biol. Chem. — 2008. — **283**, N 30. — P. 20635—20644.
31. Tabe Y., Jin L., Tsusumi-Ishii Y. et al. Activation of integrin-linked kinase is a critical pro-survival pathway induced in leukemic cells by bone-marrow-derived stromal cells // Cancer Res. — 2007. — **67**. — P. 684—694.
32. Harrison J., Zyla T., Bardes Z., Lew D. Stress-specific activation mechanisms for the «cell integrity» MAPK pathway // J. Biol. Chem. — 2004. — **79**, N 4. — P. 2616—2622.
33. Krohn K., Link J., Mason R. Molecular imaging of hypoxia // J. Nucl. Med. — 2008. — **49**. — P. 129—148.
34. Kultz D. Evolution of cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous functions // J. Exp. Biol. — 2003. — **206**. — P. 3119—3124.
35. Nadeau S., Landry J. Mechanisms of activation and regulation of the heat shock-sensitive signaling pathway // Adv. Exp. Med. Biol. — 2007. — **594**. — P. 100—113.
36. Sitia R., Braaksman I. Quality ER protein factory // Nature. — 2003. — **426**. — P. 891—894.
37. Lee K., Tirasophon W., Shen X. et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing of SP-2-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response // Genes & Devel. — 2002. — **16**. — P. 452—466.
38. Pillai S. Birth pangs: the stressful origin of lymphocytes // J. Clin. Invest. — 2005. — **115**, N 2. — P. 224—227.
39. Ma Y., Hendershot L. The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress // Cell. Stress & Chaperones. — 2002. — **7**, N 2. — P. 222—229.
40. Feder M., Hofmann G. Heat-shock proteins, molecular chaperones and the stress response: evolutionary and ecological physiology // Ann. Rev. Physiol. — 2002. — **61**. — P. 243—282.
41. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway on protein death and cell life // The EMBO J. — 1998. — **17**. — P. 7151—7160.
42. De Martino G., Gillette T. Machines for all reasons // Cell. — 2007. — **129**, N 4. — P. 659—662.
43. Varshavsky A. The N-end rule: functions, mysteries, uses // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1996. — **93**. — P. 12142—12144.
44. Hoppe T. Multiubiquitination by E4 enzyme: 'one size' doesn't fit all // Trends in Biochem Sci. — 2005. — **30**, N 4. — P. 83—187.
45. Kwansoerg A., Erlander M., Leturq D. et al. In vitro characterization of the proteasome PA 28 // J. Biol. Chem. — 1996. — **271**. — P. 18237—18242.
46. Strickland E., Hakala K., Thomas P., DeMartino G. Recognition of misfolding proteins by PA700 the regulatory subcomplex of the 26S proteasome // Ibid. — 2000. — **275**, N 8. — P. 5565—5570.
47. Masson P., Lundgren J., Young P. Drosophila proteasome regulator REG γ -transcriptional activation by DNA replication-related factor DEEF and evidence

- for a role in cell cycle progression // *J. Mol. Biol.* — 2003. — **327**. — P. 1001–1012.
48. *Lioni M., Noma K., Snyder A. et al.* Bortezomib induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway // *Mol. Cancer Therapeut.* — 2008. — **7**, N 9. — P. 2866–2875.
49. *Chen K.F., Yeh P.Y., Yeh K.H. et al.* Down regulation of Phospho-Akt is a major molecular determinant of bortezomib induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells // *Cancer Res.* — 2008. — **68**. — P. 6698–6707.
50. *Oerlemans R., Tranke N., Assaraf Y. et al.* Molecular basis of bortezomib / Velcade® resistance: proteasome subunit $\beta 5$ (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein // *Blood.* — 2008. — **112**, N 6. — P. 2489–2499.
51. *Varshavsky A.* Discovery of cellular regulation by protein degradation // *J. Biol. Chem.* — 2008. — **283**. — P. 34469–34489.

К главе 6

1. *Morgan D.* Cell cycle principles of control. — London: New Sci. Press, 2006. — 297 p.
2. *Besson A., Dowdy S.F., Roberts J.M.* CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond // *Dev. Cell.* — 2008. — **14**, N 2. — P. 159–169.
3. *Canepa E., Scassa M., Ceruti J. et al.* INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions // *IUBMB Life.* — 2008. — **59**, N 7. — P. 419–426.
4. *O'Connell M.J., Walwarth N.C., Carr A.* The G2 phase DNA damage checkpoint // *Trends Cell Biol.* — 2000. — **10**. — P. 296–303.
5. *Bakkenist C., Kastan M.* Initiating cellular stress responses // *Cell.* — 2004. — **118**, N 1. — P. 9–17.
6. *Ewald B., Sampath D., Plunkett W.* ATM and Mer11/RAD50Nbs complex respond to nucleoside analogue-induced stalled replication forks and contribute to drug resistance // *Cancer Res.* — 2008. — **68**. — P. 7947–7955.
7. *Simensson T., Pecinka P., Kubista M.* DNA tetraplex formation in the control region of c-myc // *Nucl. Acid. Res.* — 1998. — **26**, N 5. — P. 1167–1172.
8. *Yurenko E., Zhurakivsky R., Ghomi M. et al.* Comprehensive conformational analysis of the nucleoside analogue 2'-beta-deoxy-6-azacytidine by DFT and MP2 calculations // *J. Phys. Chem. B.* — 2007. — **111**. — P. 6263–6271.
9. *Yurenko E.I.* Etude de proprietes energetiques, conformationnelles et vibrationnelles des deoxyribonucleosides canoniques et modifies a l'aide des methodes de la chimie quantique ab initio. These de doctorat de l'Universite Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2007.
10. *Rohde J., Yeitman J., Cardenasd M.E.* The TOR kinase links the nutrient sensing to cell growth // *J. Biol. Chem.* — 2001. — **276**, N 13. — P. 9583–9586.
11. *O'Connell M.J., Walworth N.C., Carr A.M.* The G2-phase DNA damage checkpoint // *Trends Cell Biol.* — 2000. — **10**. — P. 296–303.
12. *Ashwell S., Zabludoff S.* DNA damage detection and repair pathways: recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy // *Clin. Cancer Res.* — 2008. — **14**. — P. 4032–4037.
13. *Xiao Z., Xue J., Sowin T.J., Zhang H.* Differential role of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2 and mitogen-activated protein kinase-activated

immediating DNA damage-induced cell cycle arrest: implications for cancer therapy // *Mol. Cancer Ther.* — 2006. — **5**, N 8. — P. 1935—1943.

14. *Chuen-Pei N.G., Lee H.C., Chung Wai Ho et al.* Differential mode of regulation of the checkpoint kinases CHK1 and CHR2 by their regulatory domains // *J. Biol. Chem.* — 2004. — **279**, N 10. — P. 8808—8819.

15. *Chen Y., Poon R.* The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability // *Front. Biosci.* 2008. — **1**, N 13. — P. 5016—5029.

16. *Ciechanover A.* The ubiquitin-proteasome pathway on protein death and cell life // *EMBO J.* — 1998. — **17**. — P. 7151—7160.

17. *Thornton B., Toczynski D.* Precise destruction: an emerging picture of APC // *Genes & Dev.* — 2006. — **20**. — P. 3069—3078.

18. *Tunquist B., Evers P., Ghem L. et al.* Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytotostatic factor-mediated metaphase arrest // *J. Cell Biol.* — 2003. — **163**, N 6. — P. 1231—1242.

19. *Babu J.R., Jeganathan K.B., Baker D.J. et al.* Rael is essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation // *J. Cell Biol.* — 2003. — **160**, N 3. — P. 341—353.

20. *Trosko J.E.* Review paper: Cancer stem cells and cancer nonstem cells: from adult stem cells or from reprogramming of differentiated somatic cells // *Vet. Pathol.* — 2009. — **46**, N 2. — P. 176—193.

К главе 7

1. *Yuan J., Hervitz H.R.* A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis // *Cell.* — 2004. — **116**. — P. 53—56.

2. *Damail N.N., Korsmeyer J.I.* Cell death: critical control points // *Ibid.* — P. 205—219.

3. *Li P., Nijhawan D., Wang X. et al.* Mitochondrial activation of apoptosis // *Ibid.* — S. 57—59.

4. *Herr I., Debatin K.M.* Cellular stress and apoptosis in cancer therapy // *Blood.* — 2001. — **98**, N 9. — P. 2603—2614.

5. *Komarov A., Rokhlin O., Yu C., Gudkov A.* Funcional genetic screening reveals the role of mitochondrial cytochrome *b* as mediator of Fas-induced apoptosis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2008. — **105**, N 38. — P. 14453—14458.

6. *Redmond K.M., Wilson T.R., Johnston P.G., Longley D.B.* Resistance mechanisms to cancer chemotherapy // *Front. Biosci.* — 2008. — **13**. — P. 5138—5154.

7. *Mita A., Mita M., Nawrecuit S., Giles E.* Survivin key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics // *Cell Cancer Res.* — 2008. — **1**, N 2. — P. 85—91.

8. *Angell H.* A study into the potential role of survivin localization in resistance to drug-induced apoptosis // *Biosci. Horizons.* — 2008. — **1**, N 2. — P. 85—91.

9. *Hosokawa N., Hara Y., Mizushima N.* Generation of cell lines with tetracycline-regulated autophagy and a role for autophagy in controlling cell size // *FEBS Lett.* — 2006. — **580**. — P. 2623—2629.

К главе 8

1. Zhao Y., Srivastava D.A. Developmental view of microRNA function // Trends Biochem. Sci. — 2007. — **32**, N 4. — P. 189–197.
2. Zhang B., Wang Q., Pan X. MicroRNA and their regulatory role in animals and plants // J. Cell Physiol. — 2007. — **210**, N 2. — P. 279–289.
3. Wang Y., Stricker H.M., Gou D., Liu L. MicroRNA: past and present // Front. Biosci. — 2007. — **12**. — P. 2316–2329.
4. Шурина Т.В., Бобровская М.Т., Козлов Э.А. МикроРНК: от фундаментальных исследований до их приложений // Биополимеры и клетка. — 2007. — **23**, № 6. — С. 467–482.
5. Hutvagner G., Zymore P.D. RNAi: nature abhors double strands // Curr. Opin. Genet. Dev. — 2002. — **15**. — P. 188–200.
6. Cogori C., Macino G. Post-transcriptional gene silencing across kingdom // Cur. Opin. Genet. Dev. — 2000. — **10**. — P. 638–643.
7. Fire A. RNA-triggered gene silencing by double-stranded RNA // Trends Genet. — 1999. — **15**. — P. 358–363.
8. Hammond S., Caudy A., Hannon G. Post-transcriptional gene silencing // Nat. Rev. Genet. — 2001. — **2**, N 2. — P. 110–119.
9. Sharp H.A. RNA interference // Genes Dev. 2001. — **15**. — P. 485–490.
10. Hannon G.J., Rossi J.J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference // Nature. — 2004. — **431**. — P. 371–378.
11. Dorsett Y., Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics // Nat. Rev. Drug Discover. — 2004. — **3**. — P. 318–329.
12. Stark A., Bushati N., Jan C.H. et al. A single Hox locus in Drosophila produces functional microRNA from opposite DNA strands // Genes Dev. — 2008. — **22**, N 1. — P. 8–13.
13. Zhang O., Sun X., Watt E.D., Al-Yasumi H.H. Resolving the motional modes that code for RNA adaptation // Science. — 2006. — **311**, N 5761. — P. 371–378.
14. Fire A., Xu S., Montgomery M. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. — 1998. — **391**, N 6699. — P. 806–811.
15. Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R. et al. How cells respond to Interferon // Annu. Rev. Biochem. — 1998. — **67**. — P. 227–264.
16. Eblashir S., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs // Genes Dev. — 2001. — **15**, N 2. — P. 188–200.
17. Lea R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin 4 encodes small RNAs with antisense to lin 14 // Cell. — 1993. — **75**, N 5. — P. 843–854.
18. Ruvkun G. Molecular biology: Glimpses of a tiny RNA world // Science. — 2001. — **294**, N 5543. — P. 797–799.
19. He L., He X., Lim L.P. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network // Nature. — 2007. — **447**, N 7148. — P. 1130–1134.
20. He L., He X., Lowe S.W., Hannon G.J. MicroRNAs join the p53 network — another piece in the tumour suppression puzzle // Nat. Rev. Cancer. — 2007. — **7**, N 11. — P. 819–822.
21. Chang T.C., Yu D., Lee Y.S. et al. Widespread microRNA repression by Myc contribution to tumorigenesis // Nat. Genet. — 2008. — **40**, N 1. — P. 43–50.

22. *Eulalio A., Behm-Ansmant I., Schweizer D., Izaurralde E.* P-bodies formation is a consequence, not the cause of RNA-mediated gene silencing // *Mol. Cell Biol.* — 2007. — **27**, N 11. — P. 3970—3981.
23. *Eulalio A., Behm-Ansmant I., Izaurralde E.* P-bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathway // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2007. — **8**, N 1. — P. 9—22.
24. *Li L.C.* Small RNA-mediated gene activation // *RNA and the regulation of gene expression: A hidden layer of complexity.* — La Tolla, USA: Caister Acad. Press, 2008. — ISBN 978-1-904455-25-7.
25. *Plau R.F., Li L.C., Pookot D. et al.* MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2008. — **105**, N 5. — P. 1608—1613.
26. *Sanchez-Elsner T., Gou D., Kremmer E., Sauer F.* Non-coding RNAs of trithorax response elements recruit Drosophila Ash1 to Ultrabithorax // *Science.* — 2006. — **311**, N 5764. — P. 1118—1123.
27. *Volpe T., Schramke V., Hamilton G. et al.* RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast // *Chromosoma Res.* — 2003. — **11**, N 2. — P. 137—146.
28. *Li L.C., Okino S.T., Zhao H. et al.* Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2006. — **103**, N 46. — P. 17337—17342.
29. *Bass B.* RNA editing by adenosine diaminases that act on RNA // *Annu. Rev. Biochem.* — 2002. — **71**. — P. 817—846.
30. *Nishikura K.* Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2006. — **7**, N 12. — P. 919—931.
31. *Amariglio N., Rechavi G.* A→I RNA editing: a new regulatory mechanism of global gene expression // *Biol. Cells Mol. Dis.* — 2007. — **39**, N 2. — P. 151—155.
32. *Das A.K., Carmichali G.G.* ADAR-edition wobbles the microRNA world // *ACS Chem. Biol.* — 2007. — **2**, N 4. — P. 217—230.
33. *Habig G.W., Dale T., Bass B.* MiRNA-editing — we should have inosine this coming // *Mol. Cell.* — 2007. — **25**, N 6. — P. 792—793.
34. *Kawahara Y., Zinshteynt B., Sethupatty H. et al.* Redirection of silencing targets by adenosine-to inosine editing of miRNAs // *Science.* — 2007. — **315**, N 5815. — P. 1137—1140.
35. *Luciano D., Mirsky H., Vendetti N., Maas S.* RNA editing of a miRNA precursor // *RNA.* — 2004. — **10**, N 8. — P. 1174—1177.
36. *Yang W., Chendrimata T., Wang Q. et al.* Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminase // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2006. — **13**, N 1. — P. 13—21.
37. *Yang W., Wang Q., Howell K. et al.* ADAR RNA deaminase limits short interfering RNA efficacy in mammalian cells // *J. Biol. Chem.* — 2005. — **280**, N 5. — P. 3946—3953.
38. *Tavazoie S.F., Akarcon C., Oskarson T. et al.* Endogenous human microRNA that suppress breast cancer metastasis // *Nature.* — 2008. — **551**, N 7175. — P. 147—152.
39. *Croce C.M.* Oncogenes and cancer // *New Engl. J. Med.* — 2006. — **358**, N 5. — P. 502—511.
40. *Yu S.L., Chen H.Y., Chang G.C. et al.* MicroRNA signature predicts survival and relapse on lung cancer // *Cancer Cell.* — 2008. — **13**, N 1. — P. 48—57.

41. *Boehm M., Slack F.J.* MicroRNA control of lifespan and metabolism // *Cell cycle*. — 2006. — **5**, N 8. — P. 837–840.
42. *Kovalchuk O., Filkowsky J., Meservy J. et al.* Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin // *Mol. Cell Ther.* — 2008. — **7**. — P. 2152–2159.
43. *Cui X.Y., Guo Y.J., Yao H.R.* Analysis of microRNA in drug resistant breast cancer cell line MCF-7/ADR // *Nang Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* — 2008. — **28**, N 10. — P. 1813–1815.
44. *Tyler M., Ghosal K., Ramaswami B. et al.* MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27^{kip1} // *J. Biol. Chem.* — 2008. — **283**, N 44. — P. 29897–29903.
45. *Blower P., Chung J.H., Verducci J. et al.* MicroRNA modulate the chemosensitivity of tumor cells // *Mol. Cancer Ther.* — 2008. — **7**, N 1. — P. 1–9.
46. *Tsasng W.P., Wong T., Cheung A. et al.* Induction of drug resistance and transformation in human cancer cells by non-coding RNA *CUDR* // *RNA.* — 2007. — **13**. — P. 890–898.
47. *Yang H., Kong W., He L. et al.* MicroRNA expression in human ovarian cancer: *miR-214* induces cell survival and cisplatin resistance by targeting *PTEN* // *Cancer Res.* — 2008. — **68**. — P. 425–433.
48. *Shi X.B., Xue L., Yang J. et al.* An androgen-regulated mRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2007. — **104**, N 50. — P. 19983–19988.
49. *Sog Z.Y., Hu H.Y., Deng L. et al.* Effect of small interfering RNA targeting multidrug resistance-related protein and bcl2 on drug resistance and apoptosis of K562 and K562/ADM cells // *Nang Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* — 2008. — **28**, N 7. — P. 1306–1308.
50. *To K., Zhan Z., Litman T., Bates S.* Regulation of ABSG2 expression at the 3', untranslated region of its mRNA through modulation of transcript stability and protein translation by a putative microRNA in the S1 colon cancer cell line // *Mol. Cell Biol.* — 2008. — **28**, N 17. — P. 5147–5161.
51. *Duan Z., Weinstein E., Ji D. et al.* Lentiviral short hairpin RNA screen of genes associated with multidrug resistance identifies PRP-4 as a new regulator of chemoresistance in human ovarian cancer // *Mol. Cancer Ther.* — 2008. — **7**, N 8. — P. 2377–2385.
52. *Kim S., Lee U.J., Kim M.N. et al.* MicroRNA *miR-199a** regulates the *MET* proto-oncogen and the downstream extracellular signal-regulated kinase (ERK2) // *J. Biol. Chem.* — 2008. — **283**, N 26. — P. 18158–18166.
53. *Lujambio A., Calin G., Vilanueva A. et al.* A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2008. — **105**, N 36. — P. 13556–13561.
54. *Kristi E., Weiss G.* Resistance may not be futile: microRNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics // *Mol. Cancer Ther.* — 2010. — **9**, N 12. — P. 3126–3136.

К главе 9

1. *Esteller M.* Epigenetics in cancer // *New Engl. J. Med.* — 2008. — **358**, N 11. — P. 1148–1159.
2. *Holliday R.* The inheritance of epigenetic defects // *Science.* — 1987. — **238**, N 4824. — P. 163–170.

3. Флаг лямбда. — М.: Мир, 1975. — 424 с.
4. Goldman R.D., Spector D.L. Live cell imaging. — Cold Spring Harbor: Scion Publ, 2005. — 631 p.
5. Cremer T., Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells // Nat. Rev. Genet. — 2001. — **2**, N 4. — P. 292–301.
6. Chevret E., Volpi E.V., Sheer D. Mini review: form and function in the human interphase chromosome // Cytogenet. Cell Genet. — 2000. — **90**, N 1/2. — P. 13–21.
7. Bickmore W.A., Chubb J.R. Chromosome position: now, where was I? // Curr. Biol. — 2003. — **13**, N 9. — P. R357–R359.
8. Parada L., Misteli T. Chromosome positioning in the interphase nucleus // Trends Cell Biol. — 2002. — **12**, N 9. — P. 425–432.
9. Parada L.A., Sotiriou S., Misteli T. Spatial genome organization // Exp. Cell Res. — 2004. — **296**, N 1. — P. 64–70.
10. Verschure P.J. Chromosome organization and gene control: it is difficult to see the picture when you are inside the frame // J. Cell Biochem. — 2006. — **99**, N 1. — P. 23–34.
11. Meaburn K.J., Misteli T., Soutoglou E. Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations // Semin Cancer Biol. — 2007. — **17**, N 1. — P. 80–90.
12. Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S. et al. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus // J. Cell Biol. — 1999. — **145**, N 6. — P. 1119–1131.
13. Черепенко О.И., Кириленко И.Н., Князева М.В. Наука о жизни: от молекул к молекулярным машинам // Укр. биохим. журн. — 2007. — **79**. — С. 118–121.
14. Wade P.A., Kikyo N. Chromatin remodeling in nuclear cloning // Eur. J. Biochem. — 2002. — **269**, N 9. — P. 2284–2287.
15. Колотова Т.Ю. и др. Нестабильность генома и эпигенетическое наследование эукариот. — Харьков: Око, 2007. — 287 p.
16. Ptashne M. On the use of the word ‘epigenetic’ // Curr. Biol. — 2007. — **17**, N 7. — P. R233–R236.
17. Chandler V.L. Paramutation: from maize to mice // Cell. — 2007. — **128**, N 4. — P. 641–645.
18. Glasspool R.M., Teodoridis J.M., Brown R. Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance // Brit. J. Cancer. — 2006. — **94**, N 8. — P. 1087–1092.
19. Кваша С.М. Сучасні методичні підходи до визначення статусу метилювання ДНК та застосування їх в онкології // Укр. біохім. журн. — 2008. — **80**, № 4. — С. 5–15.
20. Richardson A., Kaye S.B. Drug resistance in ovarian cancer: the emerging importance of gene transcription and spatio-temporal regulation of resistance // Drug Resist Updat. — 2005. — **8**, N 5. — P. 311–321.
21. Broxterman H.J., Gotink K.J., Verheul H.M.W. Understanding the causes of multidrug resistance in cancer: a comparison of doxorubicin and sunitinib // Drug Resist. Updates. — 2009. In Press, Corrected Proof.
22. Costello J.F., Fruhwald M., Smiraglia D. et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns // Nat Genet. — 2000. — **24**, N 2. — P. 132–138.

23. Chekhun V.F., Kulik G., Yutchenko O. et al. Role of DNA hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells // *Cancer Lett.* — 2006. — **231**, N 1. — P. 87–93.
24. Chekhun V.F., Kovalchuk O., Tryndyak V.P. et al. Epigenetic profiling of multidrug-resistant human MCF-7 breast adenocarcinoma cells reveals novel hyper- and hypomethylated targets // *Mol. Cancer Ther.* — 2007. — **6**, N 3. — P. 1089–1098.
25. Feinberg A.P., Ohlsson R., Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer // *Nat. Rev. Genet.* — 2006. — **7**, N 1. — P. 21–33.
26. Shen L., Kondo Y., Ahmed S. et al. Drug sensitivity prediction by CpG island methylation profile in the NCI-60 cancer cell line panel // *Cancer Res.* — 2007. — **67**, N 23. — P. 11335–11343.
27. Schwabe M., Lubbert M. Epigenetic lesions in malignant melanoma // *Curr. Pharm. Biotechnol.* — 2007. — **8**, N 6. — P. 382–387.
28. Jackson A.L., Loeb L.A. The mutation rate and cancer // *Genetics.* — 1998. — **148**, N 4. — P. 1483–1490.
29. Escoubet-Lozach L., Benner C., Kaikonen M. et al. Pomalidomide and lenalidomide induce p21 WAF-1 expression in both lymphoma and multiple myeloma through a LSD1-mediated epigenetic mechanism // *Cancer Res.* — 2009. — **69**, N 18. — P. 7347–7356.
30. Lu T., Jackson M.W., Aatcer D. et al. Validation-based insertional mutagenesis identifies lysine demethylase FBXL11 as a negative regulator of NFkappaB // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2009. — **106**, N 38. — P. 16339–16344.
31. Fojo T. Commentary: Novel therapies for cancer: why dirty might be better // *Oncologist.* — 2008. — **13**, N 3. — P. 277–283.
32. Akino T., Hida K., Hida Y. et al. Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors // *Amer. J. Pathol.* — 2009. — **175**, N 6. — P. 2657–2667.
33. Oki Y., Issa J.P. Recent clinical trials in epigenetic therapy: review // *Rev. Recent Clin. Truaks.* — 2006. — **1**, N 2. — P. 169–182.
34. Issa J.P., Kantarjian H. Targeting DNA methylation // *Clin. Cancer Res.* — 2009. — **15**. — P. 3938–3948.
35. Amatori S., Bagaloni I., Donati B., Fanelli M. DNA demethylating anti-neoplastic strategies. A comparative point of view // *Genes Cancer.* — 2010. — **1**, N 3. — P. 197–209.

К главе 10

1. Sahoo S.K., Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging // *Drug Discov. Today.* — 2003. — **8**, N 24. — P. 1112–1120.
2. Florence A. The dangers of generalization in nanotechnology // *Ibid.* — 2004. — **9**, N 2. — P. 60–61.
3. Bogunia-Kubik K., Sugisaka M. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine // *Biosystems.* — 2002. — **65**. — P. 123–138.
4. Desai M.P., Labhasetwar V., Amidon G. et al. Gastrointestinal uptake of biodegradable nanoparticles: effect of particle size // *Pharm. Res.* — 1996. — **13**. — P. 1838–1845.
5. Desai M.P., Labhasetwar V., Walter E. et al. The mechanism of uptake of biodegradable nanoparticles in Caco-2 cells is size dependent // *Pharm. Res.* — 1997. — **14**. — P. 1568–1573.

6. Panyam J., Sahoo S.K., Prabha S. et al. Fluorescent and electron microscopy probe for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles // *Int. J. Pharm.* — 2003. — **262**. — P. 1—11.
7. Thomas M., Klibanov A. et al. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine transfer of plasmid DNA into mammalian cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2003. — **100**. — P. 9138—9143.
8. Panyam J., Wen-Zhong Zhou, Prabha S. et al. Rapid endo-lysosomal escape of poly dl lactide-co-glycolide nanoparticles: implications for drug and gene delivery // *FASEB J.* — 2002. — **16**. — P. 1217—1226.
9. Thipati P.K. Dendrimer grafts for delivery of 5-fluorouracil // *Pharmazie.* — 2002. — **57**. — P. 261—264.
10. Sessa G., Weissmann G. et al. Formation of artificial liposome in vitro // *J. Clin. Invest.* — 1969. — **48**. — P. 76a—77a.
11. Шуман В. Мир камня. Драгоценные и поделочные камни. — М.: Мир, 1986. — 262 с.
12. Porter A., Gass M., Muller K. et al. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells // *Nature Biotechnol.* — 2007. — **6**, N 2. — P. 713.
13. Singh R., Pantaretto D., McCarthy D. et al. Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes towards the construction of nano-tube based gene delivery vectors // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2005. — **127**, N 12. — P. 4388—4396.
14. Gannon Ch., Cherukuri P., Yakobson B. et al. Carbon nanotube-enhanced thermal destruction of cancer cells in a non-invasive radio frequency field // *Cancer.* — 2007. — **110**. — P. 2654—2665.
15. Ittisanro Nachai S. et al. Small molecule delivery using carbon nano-test-tube // *Carbon.* — 2008. — **46**. — P. 1358—1367.
16. Marcucci F., Lefoulon F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress // *Drug Discov. Today.* — 2004. — **9**, N 5. — P. 219—228.
17. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the keynote of tumorselective macromolecular drug targeting // *Adv. Enzyme Regul.* — 2001. — **41**. — P. 189—207.
18. Sahoo S.K., Sawa T., Fang J. et al. Pegylated zink protoporphirin: a water-soluble heme oxygenase inhibitor with tumor-targeting capacity // *Bioconjugate Chem.* — 2002. — **13**. — P. 1031—1038.
19. Van Osdol, Fujimori K., Weinstein J.N. et al. An analysis of monoclonal antibody distribution in microscopic tumor module: consequences of a «binding site barrier» // *Cancer Res.* — 1991. — **51**. — P. 4776—4784.
20. Akino T., Hida Y., Tsuchiya K. et al. Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors // *Amer. J. Pathol.* — 2009. — **175**. — P. 2657—2667.
21. Alyaudtin R.M. Interaction of poly L-butylcyanoacrylate nanoparticles with the BBB in vivo and in vitro // *J. Drug Targets.* — 2001. — **9**. — P. 209—221.
22. Jain S., Mishva V., Singn P. et al. RGD-anchored magnetic liposomes for monocytes and neutrophils-mediated brain targeting // *Int. J. Pharm.* — 2003. — **261**. — P. 42—55.
23. Laakonen P., Porkka K., Hoffman J.A., Ruoslanti E. et al. A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels // *Nat. Med.* — 2002. — **8**. — P. 751—755.

24. *Porkka K., Laakonen P., Hoffman J.A. et al.* A fragment of the HMG N2 protein homes to the nuclei of tumor cells and endothelial cells in vivo // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2002. — **99**. — P. 7444–7449.
25. Cell-penetrating peptides / Ed. by U. Langel. — Boca Raton FL, USA: CRC press, 2002.
26. *Torchilin V.P. et al.* TAT peptides on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2001. — **98**. — P. 8786–8791.
27. *Kirpolin D.* Liposomes with detachable polymer coating: destabilization and fusion of dioleoylphosphatidyl ethamine vesicles triggered by cleavage of surface-grafted polyethylene glycol // FEBS Lett. — 1996. — **388**. — P. 115–118.
28. *Ji-Ho Park, Derfus A., Segal E. et al.* Local heating of discrete droplets using magnetic porous silicon-based photonic crystals // J. Amer. Chem. — 2006. — **128**, N 24. — P. 7938–7946.
29. *Rapoport N.* Combined cancer therapy by micellar-encapsulated drug and ultrasound // Int. J. Pharm. — 2004. — **27**. — P. 155–162.
30. *Gao Z., Fain H.D., Rapoport N.* Ultrasound-enhanced tumor targeting of polymeric micellar drug carriers // Mol. Pharm. — 2004. — **1**. — P. 317–330.
31. *Andreev O., Engelman D., Reshetnyak Y.* Targeting acidic-diseased tissues: new technology based on the use of the pH (low) insertion peptide // Chim. Oggi. — 2009. — **27**, N 2. — P. 34–37.
32. *Mata J., Dyal L., Slauson M. et al.* Tumor imaging using technetium bound to pH-sensitive peptides: Nanomedicine, nanotechnology // Biosensors and Medicine. — 2009. — **3**, N 4. — P. 297–305.
33. *Ozkan M.* Quantum dots and other nanoparticles: what can they offer to drug discovery? // Drug Discov. Today. — 2004. — **9**, N 24. — P. 1065–1071.
34. *Clark H.A., Hoyer M., Philbert M.A., Kopelman R.* Optimal nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 2. Sensors for pH and calcium and the intracellular application of PEBBLE sensors // Anal. Chem. — 1999. — **71**. — P. 4837–4893.
35. *Summer J.P., Kopelman R., Alexa R.* A fluorescent PEBBLE nanosensors for intracellular free zinc // Analyst. — 2002. — **127**. — P. 11–16.
36. *Wu X., Liu H., Liu J. et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker Her-2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots // Nat. Biotechnol. — 2003. — **21**. — P. 41–46.
37. *Dubertret B. et al.* In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles // Science. — 2002. — **298**. — P. 1759–1762.
38. *Mirkin C.A. et al.* A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into microscopic materials // Nature. — 1996. — **382**. — P. 607–609.
39. *Jin R.C.* What controls the melting properties of DNA-linked gold particles assemblies? // Amer. Chem. Soc. — 2003. — **125**. — P. 1643–1654.
40. *Qian X., Peng X., Ansan D. et al.* In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticles tags // Nature Biotechnol. — 2008. — **26**. — P. 83–90.
41. *Glaspel G., Fuoco L., El-Shall M.S.* Microwaves synthesis of supported Au and Pd nanoparticles catalysts for co-oxidation // J. Phys. Chem. — 2005. — **109**, N 37. — P. 17350–17355.

42. *Chang E., Miller J.S., Sun J. et al.* Protease-activated quantum dot probes // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 2005. — **334**, N 4. — P. 1317–1321.
43. *Ang L.Y., Lim M.E., Ong L.C., Zhang Y.* Applications of upconversion nanoparticles in imaging, detection and therapy // *Nanomedicine (London)*. — 2011 Sep. — **6**, N 7. — P. 1273–1288.
44. *Shao W., Wickstrom E., Panchapakesan B.* Nanotube-antibody biosensor arrays for detection of circulating breast cancer cells // *Nanotechnology*. — 2008. — **19**. — P. 465101.
45. *Jeng E.S., Moll A.E., Ray A.C. et al.* Detection of DNA hybridization using the near — infrared band-gap fluorescence of single walled carbon nanotubes // *Nano Lett.* — 2006. — **6**. — P. 371–375.
46. *Liu J., Levine A.L., Matton J.I. et al.* Nanoparticles as image enhancing agents for ultrasonography // *Phys. Med. Biol.* — 2006. — **51**, N 9. — P. 2179–2189.
47. *Moreau J.W., Weber P.K., Martin M.C., Gilbert B.* Extracellular proteins limit the dispersal of biogenic nanoparticles // *Science*. — 2007. — **316**, N 5831. — P. 1600–1603.
48. *Basu S., Harfouche R., Soni S. et al.* Nanoparticle-mediated targeting of MAPK signaling predisposes tumor to chemotherapy // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2009. — **106**, N 19. — P. 7957–7961.
49. *Oh K.T., Baik H.J., Lee A.H. et al.* The reversal of drug resistance in tumors using a drug-carrying nanoparticulate system // *Int. J. Mol. Sci.* — 2009. — **10**. — P. 3776–3792.
50. *Chen B., Wu Y., Cheng J. et al.* Mechanism research of reversal of multidrug resistance by the application of 5-bromotetrandrine and magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ combined with daunorubicin in a human-nude mice xenograft model // *Blood*. — 2008. — **112**. — Abstr. 5058.
51. *Wu Y.N., Chen B.A., Cheng J. et al.* Reversal of multidrug resistance in xenograft nude-mice by magnetic Fe(3)O(4) nanoparticles combined with daunorubicin and 5-bromotetrandrine // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. — 2009. — **17**, N 1. — P. 60–64.

К главе 11

1. *Kitano H.* Systems Biology: A brief overview // *Science*. — 2002. — **296**, N 5560. — P. 1662–1664.
2. *Kitano H.* Looking beyond the details: a rise in system-oriented approaches in genetics and molecular biology // *Curr. Genetics*. — 2002. — **41**, N 1. — P. 1–10.
3. *Way J., Silver P.* Systems engineering without an engineer: why we need systems biology: Essays and Commentaries // *Complexity*. — 2007. — **13**, N 2. — P. 22–29.
4. *Welch G.R., Clegg J.* From protoplasmic theory to cellular systems biology: A 150-year reflection // *Amer. J. Physiol.* — 2010. — **298**. — P. 1280–1290.
5. *Hayness K., Silver P.* Eukaryotic systems broaden the scope of synthetic biology // *J. Cell. Biol.* — 2009. — **187**, N 5. — P. 589–596.
6. *Wenter E.* In silico multicellular systems biology and minimal genomes // *Drug Discover. Today*. — 2003. — **8**, N 24. — P. 1121–1128.
7. *Klipp E., Herwig R., Kowald A. et al.* *Systems Biology in Practice*. — Berlin: Wiley-VCH, 2005. — 449 p.

8. *Alon U.* (7 July 2006). An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits. Chapman & Hall. — 301 P. — ISBN 978-1-584-88642-6.
9. *Колотова Т.Ю., Волянский А.Ю., Кучма И.Ю. и др.* Нестабильность генома и эпигенетическое наследование у эукарит. — Харьков: Око, 2007. — 287 с.
10. *Yurenko E.* Etude de proprietes energetiques, conformationnelles et vibrationnelles des deoxyribonucleosides canoniques et modifies a l'aide des methodes de la chimie quantique ab initio. These de doctorat de l'Universite Pierre et Marie Curie-Paris VI. — 2007.
11. *Schwartz R.S.* Paul Ehrlich «Magic bullets» // *New Engl. J. Med.* — 2004. — **350**. — P. 1079—1080.
12. *Gibson D.G., Glass J., Lartigue C. et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome // *Science*. — 2010. — Jul 2. — **329**, N 5987. — P. 52—56.
13. *Glass J., Assad-Garcia N., Aloverovich N. et al.* Essential genes of a minimal bacterium // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2006. — **103**, N 2. — P. 425—430.
14. *Naesby M., Nilsen S.V., Nilsen S.A. et al.* Yeast artificial chromosome employed for random assembly of biosynthetic pathways and production of diverse compounds in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbial Cell Factories*. — 2009. — **8**, N 1. — P. 45—59.
15. *Celia M.H.* Systems biology. Integrative approach in which scientists study pathways and networks will touch all areas of biology, including drug discovery // *Chem. & Engineer. news*. — 2003. — **81**, N 20. — P. 45—55.
16. *Chen B.J., Causten H., Mancenido D. et al.* Harnessing gene expression to identify genetic bases of drug resistance // *Mol. Systems Biol.* — 2009. — **5**. — P. 310—329.
17. *Flannagan N.* Systems biology alters drug development. Omics tool revolutionize field, but deciphering high-throughput data is still a major obstacle // *Genet. Engineering*. — 2008. — **28**. — P. 1—5.
18. *Chen J., Shen C., Yan C. et al.* Systems biology case study of ovarian cancer drug resistance // *Comp. Systems Bioinformatics: Conf. proc.* — 2006. — Vol. 4. — P. 389—398.
19. *Covert M.W., Schilling C.H., Famili I. et al.* Metabolic modeling of microbial strains in silico // *Trends in Biochem. Sci.* — 2001. — **26**. — P. 179—186.
20. *Edwards J.S., Covert M., Palsson B.Ø.* Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach // *Environ. Microbiol.* — 2002. — **4**. — P. 133—140.
21. *Shih-Yi Chao, Chiang J.H., Huang A.M., Chang W.S.* An integrative approach to identifying cancer chemoresistance-associated pathways // *BMC Med. Genom.* — 2011. — **4**. — P. 23—40.

К главе 12

1. *Amrhein N., Deus B., Gehrke P., Steinrucken H.* The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro // *Plant Physiol.* — 1980. — **66**, N 5. — P. 830—834.
2. *Steinrucken H., Amrhein N.* The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase // *Biochim. and Biophys. Res. Commun.* — 1980. — **94**, N 4. — P. 1207—1212.
3. *Comai L., Shen L., Stalker D.* An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate // *Science*. — 1983. — **221**, N 1. — P. 370—371.

4. Pipke R., Amrhein N. Carbon-phosphorus lyase activity of permeabilised cells of *Anthrobacter* sp. GLP-1 // FEBS Lett. — 1988. — **235**, N 1. — P. 135—138.
5. Segal G.A. A review of the genetic effects of ethylmethanesulfonate // Mut. Res. — 1984. — **134**, N 2/3. — P. 113—142.
6. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 436 с.
7. Chao L., Tillman M. Enhanced resistance to nitrosoguanidine killing and mutagenesis in a DNA gyrase A mutant of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1982. — **151**, N 2. — P. 764—770.
8. Маниатис Т., Фритч Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: методы генетической инженерии. — М.: Мир, 1984. — 394 с.
9. Glass J., Assad-Garcia N., Aloverovich N. et al. Essential genes of a minimal bacterium // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2006. — **103**, N 2. — P. 425—430.
10. Cherepenko E., Karpenko O. Uptake of the herbicidal glyphosate by *Escherichia coli* K-12 // Biosci Rep. — 1999. — **19**, N 1. — P. 43—49.
11. Hayes J., Wolf C.R. Molecular mechanisms of drug resistance // Biochem J. — 1990. — **272**, N 1. — P. 281—295.
12. Hooper D. Target modification as a mechanism of antimicrobial resistance // Bacterial resistance to antimicrobials / Eds K. Lewis et al. — New York; Basel: Marcel Dekker Inc., 2002. — P. 161—192.
13. Neuhard J., Nygaard P. Purines and pyrimidines // *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology / Eds F. Neidhardt et al. — Washington DC: ASM Press, 1987. — Vol. 1. — P. 445—473.
14. Jochimsen B., Nygaard P., Vestergaard T. Location on the chromosome of *Escherichia coli* of genes governing purine metabolism // Mol. and Gen. Genet. — 1975. — **143**, N 1. — P. 85—91.
15. Craig S. Purine salvage enzymes as targets for chemotherapeutic treatment of parasitic diseases // Биополимеры и клетка. — 1997. — **19**, № 1. — С. 65—71.
16. Cherepenko E.I., Craig S. Genetic mechanisms of *Escherichia coli* resistance to target inactivation: Genes governing purine metabolism in enterobacteria and an unexpected sequence found via complementation selection // Там же. — 1997. — **19**, № 3. — С. 403—407.
17. Viswanathan A., Lanjuin S., Lovett S. Identification of of RNaseT as a high-copy suppressor of the UV sensitivity associated with single-strand DNA exonuclease deficiency in *Escherichia coli* // Genetics. — 1999. — **151**, N 3. — P. 929—934.
18. Cashel M., Rudd K. The stringent response. — *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology / Eds F. Neudhardt et al. — 1987. — Vol. 2. — P. 1470—1538.
19. Белицкий Б., Кулакаукас С., Суходолец В. Точное картирование гена *gpp*, участвующего в синтезе гуанозинтетрафосфата и получение делеции *ilvC-gpp* области хромосомы *Escherichia coli* // Генетика. — 1986. — **22**, N 12. — С. 2775—2783.
20. Yavatchev L., Ivanov I. What does homology between *Escherichia coli* tRNAs and RNAs controlling ColEI plasmid replication mean? // J. Theor. Biol. — 1988. — **131**, N 2. — P. 235—239.
21. Черепенко Е.И. Предотвращение термоинактивации фенилаланил-тРНК синтазы *Escherichia coli* с помощью плазмид ColEI ряда. — Biopolym. Cell. — 1994. — **10**, N 3/4. — С. 75—78.

22. Kohara Y., Akiyama K., Isono K. The physical map of the whole *Escherichia coli* chromosome // Cell. — 1987. — N 2. — P. 495—508.
23. Rudd K. Linkage map of *Escherichia coli* K-12. Edition 10: The physical map // Microbiol. Molec. Biol. Rev. — 1998. — 62, N 3. — P. 985—1019.
24. Черепенко Е.И., Говорун Д.Н. К проблеме множественной лекарственной устойчивости: гипермутабильность как механизм защиты метаболических мишеней бактериальной клетки от цитотоксических ксенобиотиков // Biopolym. Cell. — 2004. — 20, N 3. — P. 193—207.
25. Cherepenko Y., Hovorun D. Bacterial multidrug resistance unrelated to multidrug exporters: cell biology insight // Cell Biol. Intern. — 2005. — 29, N 1. — P. 3—7.
26. Sanford K., Soucaille Ph., Whited G., Chotani G. Genomics to fluxomics and physiomics — pathway engineering // Curr. Opin. Microbiol. — 2002. — 5. — P. 318—322.
27. Ellis R.G. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated // Trends Biochem. — 2001. — 26, N 3. — P. 597—604.
28. Uverski V. Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics // Protein Sci. — 2002. — 11, N 5. — P. 739—756.
29. Черепенко Е.И. Рецессивные гены хеморезистентности *Escherichia coli*, не определяющие поступление ингибиторов в клетки // Доп. НАН Украины. — 2003. — 2. — С. 200—203.
30. Черепенко Е.И. Рекомбинация в клетках *Escherichia coli* и многообразие форм цитотоксической устойчивости // Укр. біохім. журн. — 2003. — 75, № 1. — С. 25—28.
31. Черепенко Е.И., Грабко В.И. Мутагенное действие ДНК: изучение трансформирующей активности ДНК, введенной с пищей в личинки // Молекуляр. биология. — Киев, 1976. — 12. — С. 131—137.
32. Kishore G., Shah D. Aminoacid biosynthesis inhibitors as herbicides // Ann. Rev. Biochem. — 1988. — 57. — P. 627—663.

К заключению

1. Neu H.C. The crisis in antibiotic resistance // Science. — 1992. — 257. — P. 1064—1073.
2. Oh K.T., Baik H.J., Lee A.H. et al. The reversal of drug resistance in tumors using drug-carrying nanoparticulate system // Int. J. Mol. Sci. — 2009. — 10. — P. 3776—3792.
3. Kultz D. Evolution of cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous functions // J. Exp. Biol. — 2003. — 206. — P. 3119—3124.
4. Fojo T. Commentary: Novel therapies for cancer: why dirty might be better // The Oncologist. — 2008. — 13, N 3. — P. 277—283.
5. Kristi E., Weiss G. Resistance may not be futile: microRNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics // Mol. Cancer Ther. — 2010. — 9, N 12. — P. 3126—3136.
6. Shih-Yi Chao, Chiang J.H., Huang A.M., Chang W.S. An integrative approach to identifying cancer chemoresistance-associated pathways. BMC // Med. Genomics. — 2011. — 4. — P. 23—40.
7. Drews J. Strategic trends in the drug industry // Drug Discover. Today. — 2003. — 8. — P. 411—420.

8. *Hemmilä I., Hurskainen P.* Novel detection strategies for drug discovery // *Ibid.* — 2002. — 7, N 18. — P. S150—S156.
9. *Drews J.* Genomic sciences and the medicine tomorrow // *Nat. Biotech.* — 1996. — 14. — P. 1516—1518.
10. *Torchillin V.P., Lukyanov A.* Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions // *Drug Discover. Today.* — 2003. — 8, N 6. — P. 259—266.
11. *Richard J.P., Melikov K., Vives E. et al.* Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanisms of cellular uptake // *J. Biol. Chem.* — 2003. — 278. — P. 585—590.
12. *Midoux P., Kichler A., Boutin V. et al.* Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines // *Bioconj. Chem.* — 1998. — 9. — P. 260—267.
13. *Tseng Y.L., Liu J.I., Hong R.L. et al.* Translocation of liposomes into cancer cells by cell penetrating peptides penetratin and Tat: a kinetic and efficacy study // *Mol. Pharmacol.* — 2002. — 62. — P. 864—872.
14. *Torchillin V.P.* Tat peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperatures and in the presence of metabolic inhibitors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2001. — 98. — P. 8786—8791.
15. *Harris J.M., Martin N.E., Modi M. et al.* Pegylation a novel process for modifying pharmacokinetics // *Clin. Pharmacokinet.* — 2001. — 40. — P. 539—551.
16. *Veronese E.M., Harris J.M.* Introduction and overview of peptide and protein pegylation // *Adv. Drug Deliver. Rev.* — 2002. — 54. — P. 453—456.
17. *Roberts M.J., Benley M.D., Harris M.T. et al.* Chemistry for peptide and protein PEGylation // *Adv. Drug Deliver. Rev.* — 2002. — 54. — P. 459—461.
18. *Solyanik G.I.* Multifactorial nature of tumor drug resistance // *Exp. Oncol.* — 2010. — 32, N 3. — P. 181—185.
19. *DeClerck Y.* The bone marrow microenvironment in drug resistance // *FFCR 102nd Ann. Meet.*, 2—6 apr. 2011. — P. 49—54.

Наукове видання

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

ЧЕРЕПЕНКО Олена Йосипівна

**МОЛЕКУЛЯРНІ
ЗАХИСНІ МЕХАНІЗМИ
КЛІТИНИ
І ФАРМАКОТЕРАПІЯ**

Російською мовою

Київ, Науково-виробниче підприємство
«Видавництво “Наукова думка” НАН України», 2012

Художнє оформлення Л.А. Б о р о в с ь к а
Художній редактор І.П. С а в и ц ь к а
Технічний редактор Т.С. Б е р е з ь к а
Коректор Ю.М. К и р п и ч
Оператори О.О. І щ е н к о, В.Г. К а м е н ь к о в и ч
Комп'ютерна верстка О.О. Б а л ю к

Підп. до друку 25.09.2012. Формат 60×90/16. Папір офс. № 1. Гарн. Таймс.
Друк офс. Фіз. друк. арк. 16,5 + 1,0 арк. вкл. на крейд. пап.
Ум. друк. арк. 17,5. Ум. фарбо-відб. 21,0.
Обл.-вид. арк. 18,0. Наклад 300 прим. Зам. № 12—359

НВП «Видавництво “Наукова думка” НАН України»
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру видавців, виготівників
і розповсюджувачів видавничої продукції
ДК № 2440 від 15.03.2006 р.
01601 Київ 1, вул. Терещенківська, 3

ПП «Видавництво “Фенікс”»
03680 Київ, вул. Шутова, 13^б

