

НОВОСТИ НАУКИ

НОБЕЛЕВСКАЯ ПРЕМИЯ ПО ХИМИИ ЗА 2004 ГОД

Нобелевскую премию по химии за 2004 год получили трое ученых Aaron Ciechanover, Avram Hershko и Irwin Rose, открывшие убиквитин-зависимый протеолиз, - процесс, в ходе которого ферментная система "метит" нежелательные белки при помощи 76-членного белка убиквитина. Меченые таким образом белки транспортируются в протеасому - большой протеазный комплекс, в котором и происходит их деградация. Многочисленные клеточные процессы, регулируемые убиквитин-зависимым протеолизом, включают клеточный цикл, репарацию ДНК и транскрипцию, контроль качества белка и иммунные реакции. Дефекты такого протеолиза рассматриваются в качестве первопричины возникновения многих заболеваний человека, включая рак.

Долгое время процессу деградации белков уделяли незаслуженно мало внимания. Первым исследователем в этой области стал Schoenheimer, который в 1942 году опубликовал результаты, указывающие на то, что белки в организме животных непрерывно синтезируются и деградируют и потому находятся в динамичном состоянии. В 1953 году Simpson обнаружил, что внутриклеточная деградация белка требует затрат энергии. В дальнейшем внимание ученых к нерегулируемому протеолизу в лизосомах затормозило развитие исследований по энергозависимому протеолизу. И лишь стремление Hershko понять механизм энергозависимой внутриклеточной деградации белков привело к открытию убиквитин-зависимого протеолиза.

A. Hershko работал в лаборатории G. Tomkins, занимаясь изучением энергозависимой деградации тирозинаминотрансферазы в культивируемых клетках гепатомы. A. Hershko и G. Tomkins предположили, что АТФ участвует в качестве источника энергии на ранней стадии ферментной деградации. Позднее A. Ciechanover обнаружил, что деградация тирозинаминотрансферазы действительно убиквитин-зависима.

Убиквитин был сначала выделен из тимуса коровы, позднее его нашли во многих различных тканях и организмах. Убиквитин - небольшой белок, состоящий из 76 аминокислотных остатков. Первоначально предполагалось, что он участвует в дифференцировке лимфоцитов. Первое наблюдение его ковалентного присоединения к другому белку осуществил ученый H. Busch и его коллеги. Они назвали форму моноубиквитинированного гистона H2A "белком A24".

Важным методологическим шагом в изучении энергозависимой деградации белка стала разработка бесклеточной системы, способной к деградации "неправильных" белков АТФ-зависимым способом. Используя лизат ретикулоцитов кролика, ученые обнаружили, что протеолитическая активность с оптимумом $pH=7,8$, исключает участие лизосом, большинство протеаз которых проявляют оптимальную активность в кислом диапазоне pH .

Используя систему лизата ретикулоцитов, Aaron Ciechanover, Avram Hershko и Irwin Rose в ходе биохимических исследований в конце 1970-х - начале 1980-х годов обнаружили и охарактеризовали АТФ-зависимую систему деградации белка убиквитина. Основная часть работы была проведена Ciechanover и Hershko в лаборатории Rose, в онкологическом центре Fox Chase в Филадельфии.

НОВОСТИ НАУКИ

Первое исследование началось в 1978 году, когда лизат ретикулоцитов был разделен на две фракции, каждая из которых была неактивна. Однако после рекомбинации этих двух фракций, АТР-зависимый протеолиз восстанавливался. Термостабильный белок, позже названный APF-1, с молекулярной массой около 9000 Да, был идентифицирован как активный компонент в первой фракции (позднее этот белок был идентифицирован учеными Wilkinson, Urban и Haas как убиквитин).

В 1981 году Hershko, Ciechanover и Rose в результате разделения второй фракции лизата ретикулоцитов получили АТР-стабилизированный белок (около 450 кДа) и новую фракцию, содержащую так называемые ферменты E1-E3. Все три фракции были необходимы для деградации меченого ^{125}I -альбумина - нового субстрата, который был в меньшей степени подвержен АТР-независимому протеолизу, чем глобин, использованный ранее в качестве субстрата.

Настоящий прорыв произошел в 1980 году. Два доклада о результатах ошеломляющих исследований были опубликованы в 1979 году в журнале Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. До этого времени роль APF-1 была неизвестна; результаты, опубликованные в первом сообщении, отчетливо продемонстрировали, что APF-1 ^{125}I связывался ковалентно с множеством белков в лизате.

Во втором сообщении вместо белка APF-1 были помечены три других белка, лизоцим, α -лактальбумин и глобин. Оказалось, что к молекуле субстрата может быть присоединено несколько полипептидов APF-1. Устойчивость конъюгатов к щелочи и гидроксиламину означала существование амидной связи посредством ϵ -аминогруппы лизина. Деубиквитинирующая активность фермента, обнаруженная в лизате ретикулоцитов, осуществляла высвобождение конъюгированного убиквитина из молекул субстрата. Таким образом, в докладе обозначено две новых ферментных активности: амид-синтетаза белка APF-1 и амидаза.

В более поздних публикациях было доказано, что белок APF-1 идентичен убиквитину. Авторы предположили, что скорее всего, убиквитин-зависимый протеолиз играет чрезвычайно важную роль, поскольку убиквитин содержит высоко консервативную аминокислотную последовательность и широко распространен среди различных эукариот.

В начале 1980-х годов Hershko, Ciechanover и Rose разработали многоступенчатую "убиквитиновую" гипотезу, которая вошла во все учебники по биохимии. Эти ученые впервые идентифицировали и выделили убиквитин-активирующий фермент E1.

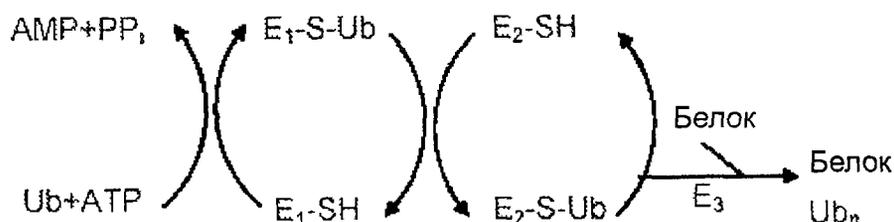
Результаты многочисленных исследований подтвердили предположение о том, что убиквитин-активирующий фермент E1 катализировал двухступенчатую реакцию: сначала происходила активация С-концевой карбоксильной группы убиквитина с образованием аденилата. Эта реакция протекает с потреблением АТР и высвобождением пирофосфата. Потом аденилат перемещается к акцепторной SH-группе с высвобождением АМР.

В процессе очистки убиквитин-активирующего фермента E1 был разработан ковалентный метод аффинной хроматографии, сыгравший важную роль и в очистке ферментов E2 и E3.

Первоначальная стадия исследований убиквитин-зависимого протеолиза завершилась идентификацией убиквитин-конъюгированного фермента E2 и убиквитин-белковой лигазы E3. Поскольку убиквитин-активирующий фермент E1 не может самостоятельно формировать убиквитин-белковые конъюгаты, ученые использовали недавно разработанный метод ковалентной аффинной хроматографии для очистки двух последующих ферментов E2 и E3. Пропускание лизата ретикулоцитов через колонку с убиквитин-сефарозой в отсутствие АТР приводило к значительному снижению протеолитической активности. Поскольку убиквитин-активирующий фермент связывался с колонкой только в присутствии АТР, полученные результаты свидетельствовали о том, что другие факторы протеолитической системы удерживались на колонке.

НОВОСТИ НАУКИ

Для связывания E2 с убиквитин-сефарозой требовались фермент E1 и АТФ, а связывание E3 с этим сорбентом не зависело от этих факторов. Результаты исследований показали, что E1, вероятно, может перемещать убиквитин к ферменту E2, а E2 может участвовать в перемещении убиквитина от E1 к субстрату. Тиоэфир убиквитина с E1 не диссоциировал в процессе SDS-электрофореза в полиакриламидном геле, и такая устойчивость позволила осуществить поиск возможного перемещения ^{125}I -убиквитина от E1 до E2 в геле. Никакого перемещения убиквитина от E1-убиквитина к E3 обнаружено не было. Вместо этого E3 катализировал перемещение меченного убиквитина от E2 к белковому субстрату, формируя амидные связи, устойчивые к β -меркаптоэтанолу. Все это позволило понять путь конъюгации активированного убиквитина, связанный через $-\text{COOH}$ концы к тиоловому сайту E1, сначала перемещается к другому тиоловому участку на E2. Затем в присутствии E3 убиквитин перемещается далее от E2 с образованием устойчивых белковых конъюгатов. E3 катализирует полиубиквитинирование на субстрате.



Все рассмотренные выше исследования были проведены в бесклеточной системе. Для изучения физиологических функций убиквитин-зависимого протеолиза Hershko разработал иммунохимический метод выделения убиквитин-белковых конъюгатов из интактных клеток. Используя антитела против убиквитина, ученые смогли точно определить специфический протеолиз белкового субстрата в конъюгатах убиквитина. Результаты показали значительный рост меченных конъюгатов убиквитин-белок в процессе формирования аномальных белков в ретикулоцитах, вызванный добавлением к клеткам аналогов аминокислот. Убиквитин-белковые конъюгаты деградировали намного быстрее, чем обычные клеточные белки. Это феноменальное явление наблюдали не только в ретикулоцитах, но и в карциномах асцитных клеток Эрлиха. Это свидетельствовало в пользу того, что деградация аномальных внутриклеточных белков осуществляется путем убиквитин-зависимого протеолиза.

С конца 1980-х годов многими учеными идентифицированы физиологические субстраты убиквитин-зависимый протеолизной системы, играющие важную роль в клеточном цикле, процессах репарации ДНК, возникновения рака, индукции апоптоза, а также иммунных и воспалительных реакций.

Убиквитин-зависимая система стала перспективной мишенью, использующейся для разработки лекарственных препаратов для лечения различных заболеваний. Такие лекарства могут быть использованы против компонентов убиквитин-зависимый протеолизной системы для предотвращения деградации специфических белков, или, наоборот, лекарства могут стимулировать систему к уничтожению аномальных и нежелательных белков.

ВВЕДЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ siRNAs - ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ СПОСОБ БЛОКИРОВАНИЯ ГЕНА

Интерференционная РНК (RNAi, РНКи) широко применяется в постгеномных исследованиях для подтверждения существующих мишеней *in vivo* и разработки терапевтических лекарственных средств. Введение гена интерференционной РНК *in vivo*, используя систему доставки вирусного вектора, а также внутривенное введение синтетических siRNAs (chemically modified short interfering RNAs), позволяет заблокировать интересующий ген.

Хотя на сегодняшний день неясно, могут ли иметь эти подходы клиническое применение, есть сообщения о блокировании гена *in vivo* после местного введения (в стекловидное тело, интраназально и интратекально) siRNAs в изолированные анатомические участки в моделях неоваскуляризации, ишемии/реперфузии легкого и более неврогического характера соответственно. Эти подходы наглядно показывают возможности доставки siRNA к различным органам и тканям (глаза, легкие и центральная нервная система). Тем не менее, на сегодняшний день в литературе нет данных о системной активности siRNAs в отношении эндогенных мишеней при клинически приемлемых способах введения. Важнейшим требованием для достижения системной интерференции РНК *in vivo* является придание синтетическим siRNAs таких "лекарственных" свойств как: стабильность, доставка в клетки и тканевая биодоступность.

В исследовании потенциала синтетической siRNA с целью блокирования эндогенных генов-мишеней, ученые обнаружили, что химически стабилизированные и конъюгированные с холестерином siRNAs (chol-siRNA) заметно улучшили фармакологические свойства *in vitro* и *in vivo*. Химически устойчивые siRNAs с частичным фосфоротиоатным скелетом и 2'-О-метил-модифицированными сахарами на смысловых и антисмысловых цепях продемонстрировали значительное увеличение устойчивости к деградации экзо- и эндонуклеазами сыворотки и тканевых гомогенатов. Конъюгирование холестерина с 3'-концом смысловой цепи молекулы siRNA при помощи пирролидинного линкера, приводящее к образованию chol-siRNA, не приводило к потере модифицированной таким образом siRNA ген-блокирующей активности в культуре клеток. В отличие от неконъюгированных siRNAs, chol-siRNA, введенная в люциферазу (chol-luc-siRNA), снижала активность люциферазы в клетках HeLa со значением IC₅₀ (концентрация, вызывающая 50% ингибирование) приблизительно 200 нМ в отсутствие трансфекционных реактивов или электропорации. В отличие от неконъюгированных siRNAs, chol-siRNAs связывались с сывороточным альбумином человека (HSA) (константа диссоциации комплекса chol-siRNA-HSA - 1 мкМ). Возможно, из-за увеличенного связывания с белками сыворотки, при внутривенном введении крысам chol-siRNAs демонстрировали улучшенные фармакокинетические свойства *in vivo*. При внутривенных инъекциях крысам радиоактивно меченой chol-siRNAs (50 мг/кг) время полужизни препарата в плазме крови составило 95 мин. В аналогичных условиях время полужизни неконъюгированных siRNAs было всего 6 минут. Согласно данным RPA-анализа рибонуклеазы (*Ribonuclease Protection Assay*), chol-siRNAs (но не siRNAs) были обнаружены в тканях даже через 24 часа после введения мышам. Значительные уровни chol-siRNAs были найдены в печени, сердце, почке, жировой ткани и в тканевых образцах легкого. В целом эти исследования показывают, что конъюгация холестерина значительно улучшает фармакологические свойства siRNAs *in vivo*.

Аполипопротеин В - белок, необходимый для формирования липопротеинов низкой плотности (LDL). Он является лигандом для LDL рецептора. Мышиный apoВ представляет собой большой белок, насчитывающий в своем составе 4515

НОВОСТИ НАУКИ

аминокислотных остатков. Его экспрессия преобладает в печени и тощей кишке. ApoB мРНК является предметом посттранскрипционного редактирования. "Неотредактированные" и "отредактированные" транскрипты кодируют: полноразмерный белок apoB-100 и укороченную с С-конца изоформу apoB-48 соответственно. У мышей такое редактирование apoB мРНК обнаружено в печени, и в тощей кишке: apoB-48 - преобладает в тощей кишке, а apoB-48 и apoB-100 - в печени. Гетерозиготные мыши с нокаутированным геном apoB проявляют уменьшение уровня холестерина на 20%; эти животные устойчивы к диетической гиперхолестеринемии.

Сывороточные уровни apoB, LDL и холестерина в значительной степени связаны с повышенным риском развития ишемической болезни сердца (ИБС). Уменьшенное количество функциональных LDL-рецепторов на поверхности клетки, препятствующее рецепторному удалению белка apoB, содержащего LDL, из циркуляции лежит в основе семейной гиперхолестеринемии. У пациентов с гомозиготной и гетерозиготной формами гиперхолестеринемии отмечено учащение случаев атеросклероза, ИБС и увеличение смертности от этих заболеваний. Наоборот, у пациентов, страдающих гипобеталипопротеинемией, отмечены уменьшение уровней LDL и холестерина и снижение риска возникновения ИБС. Поэтому снижение сывороточного холестерина и LDL является важной клинической стратегией лечения ИБС. Такого снижения удается достичь с помощью модификации диетических источников холестерина и фармакологического ингибирования эндогенного синтеза холестерина. Однако, несмотря на значительные успехи в области лечения ИБС, миллионы пациентов по-прежнему подвержены высокому риску возникновения этого заболевания и его клиническим осложнениям (инфаркт миокарда и сердечная недостаточность).

С использованием методов биоинформатики авторами статьи Jurgen Soutschek, Akin Akinc et al. "Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs", опубликованной в журнале "Nature", том 432, 11 ноября 2004 г; стр. 173, были разработаны и синтезированы 84 siRNAs, специфические для apoB мРНК человека и мыши. Эти apoB-siRNAs были проверены на способность уменьшать уровень apoB мРНК и белка, о чем судили по полимеразной цепной реакции (PCR), RT-PCR и ИФА соответственно, в клетках печени HepG2 после трансфекции в концентрации 100 нМ. Авторы идентифицировали пять apoB-siRNAs, снижающих уровень мРНК и белка apoB более чем на 70 %.

Поскольку экзонуклеазное расщепление служит основным механизмом деградации siRNA в сыворотке, две отобранных apoB-siRNAs (apoB-1-siRNA и apoB-2-siRNA) и соответствующий контроль apoB-1-siRNA, несущий одно четырехнуклеотидное нарушение спаривания (*four nucleotide mismatch control*), (mismatch-siRNA) были стабилизированы на 3'-концах смысловых и антисмысловых цепей при помощи фосфоротиоатной модификации и дополнительного включения двух 2'-О-метил нуклеотидов на 3' -концы антисмысловой цепи. Chol-siRNAs были синтезированы путем присоединения холестерина к 3'-концу смысловой цепи пирролидиновым линкером. Chol-apoB-1-siRNA оказался значительно более устойчивым, чем неконъюгированный apoB-1-siRNA в сыворотке крови человека. Похожие данные были получены для chol-apoB-2-siRNA, хотя эта siRNA оказалась менее устойчива, чем chol-apoB-1-siRNA. Две конъюгированные контрольные siRNAs (chol-luc-siRNA и chol-mismatch-siRNA) не выявили существенного ингибирования экспрессии apoB. Напротив, три siRNAs (неконъюгированная apoB-1-siRNA, chol-apoB-1-siRNA и chol-apoB-2-siRNA) выявили эффективное дозозависимое блокирование экспрессии apoB со значениями IC₅₀ - 0,5 нМ, 5 нМ и 8 нМ. Для выявления способности chol-apoB-siRNAs блокировать экспрессию apoB *in vivo* были выполнены исследования на обычных мышах C57BL/6. Спустя сутки после последней инъекции siRNA была обнаружена в ткани печени и тощей кишки. Значительные уровни chol-luc-siRNA,

НОВОСТИ НАУКИ

chol-apoB-1-siRNA и chol-mismatch-siRNA были обнаружены в печени и тощей кишке (100-200 нг/г ткани для chol-apoB-1-siRNA). При этом уровни некоъюгированной apoB-1-siRNA были ниже предела обнаружения. Уровни chol-apoB-2-siRNA были также обнаружены, однако они составляли всего 10% от уровня других chol-siRNAs.

Введение chol-apoB-1-siRNA и chol-apoB-2-siRNA мышам приводило к существенному снижению (на 57 ± 6 и $36 \pm 8\%$) уровней apoB мРНК в ткани печени по сравнению контролем. В образцах ткани тощей кишки у мышей, которым вводили chol-apoB-1-siRNA и chol-apoB-2-siRNA, было обнаружено более существенное уменьшение apoB мРНК (на $73 \pm 10\%$ и $51 \pm 13\%$). В дополнение к эффектам на уровень apoB мРНК, введение chol-apoB-1-siRNA и chol-apoB-2-siRNA приводило к снижению apoB-100 в сыворотке (через сутки после применения siRNA) на $68 \pm 14\%$ и $31 \pm 18\%$.

Для подтверждения физиологической важности блокирования apoB мРНК в метаболизме липопротеинов, авторы изучили эффект введения siRNA на уровень apoB, профиль липопротеинов и уровень холестерина, концентрации хиломикрон, липопротеинов очень низкой плотности (VLDL), LDL и высокой плотности (HDL). Как и ожидалось, фракция HDL преобладала в плазме мыши. Подобно результатам, наблюдаемым у гетерозиготных нокаутных мышей для apoB9, введение chol-apoB-1-siRNA приводило к 25%-ому снижению концентрации HDL.

Введение chol-apoB-1-siRNA мышам приводило к 50%-ному снижению уровня хиломикрон и 40%-ному снижению уровня LDL, в то время как концентрация VLDL не изменилась. Введение контрольных siRNAs не влияло на профиль липопротеинов. Помимо снижения концентраций липопротеинов блокирование apoB *in vivo* введением chol-apoB-1-siRNA приводило к существенному снижению ($37 \pm 11\%$) холестерина плазмы по сравнению с контролем. Введение chol-apoB-2-siRNA было менее эффективным. Введение chol-apoB-1-siRNA также приводило к 44 %-ному уменьшению уровня LDL-холестерина, одновременно с изменениями уровня apoB.

Далее авторы статьи продолжили исследования на трансгенных мышях, экспрессирующих apoB человека. Эти мыши экспрессировали apoB-100 человека в печени. У них наблюдали увеличение уровня apoB. При содержании таких мышей на высококалорийной диете у животных развивался тяжелый атеросклероз.

Введение трансгенным мышам chol-apoB-1-siRNA приводило к значительному снижению эндогенного мышиногo apoB, экспрессированного в клетках печени и тощей кишки. Относительно контрольных групп животных, которым вводили солевой раствор, уровни apoB мРНК мышей сократились на $57 \pm 10\%$ в печени и $42 \pm 12\%$ в тощей кишке. Chol-apoB-1-siRNA, которая была "отобрана" для экспериментальной работы частично вследствие идентичности нуклеотидной последовательности apoB у человека и мыши, вызвала существенное блокирование трансгена человека, экспрессированного в печени, где было обнаружено снижение apoB мРНК человека на $60 \pm 10\%$. Chol-mismatch-siRNA, использованная в качестве независимого контроля, не влияла на уровни apoB мРНК человека и мыши. Эти результаты наглядно подтверждают эффект влияния специфической chol-siRNAs на блокирование apoB во всех экспериментальных моделях.

Чтобы доказать, что активность *in vivo* произошла вследствие siRNA-направленного расщепления (siRNA-directed cleavage), ученые охарактеризовали специфические продукты расщепления мРНК, используя модифицированный 5'-RACE-метод (rapid amplification of cDNA ends) и PCR. Этот метод уже использовался в других работах для демонстрации микроРНК-направленного расщепления мРНК продуктов в растениях и в эмбрионах мышей.

Результаты секвенирования выявили специфический участок расщепления открытой рамки считывания apoB как в печени, так и в тощей кишке животных,

НОВОСТИ НАУКИ

получающих chol-apoB-1-siRNA. Такие фрагменты не были обнаружены в тканях животных, получающих контрольную siRNAs (chol-luc-siRNA или chol-mismatch-siRNA) или солевой раствор.

Результаты данного исследования наглядно показывают, что РНКи может использоваться для эффективной блокировки генов, ответственных за возникновения болезней человека. Важно отметить, что этот эффект наблюдается при клинически приемлемом подборе как способа введения, так и состава этого потенциального лекарственного средства. В данном исследовании ученые показали, что механизм действия химически модифицированной синтетической РНК осуществляется при помощи РНКи-зависимой деградации целевой мРНК. Chol-apoB-siRNAs, в отличие от неконъюгированной apoB-siRNAs, проявила биологическую активность, демонстрируя важную роль в холестерин-конъюгации siRNAs для достижения системной *in vivo* активности и предлагая тем самым возможности для дальнейшего исследования систематической активности, применяя тактику химической конъюгации. Эти результаты вселяют надежду на разработку нового класса лекарственных препаратов, которые будут использовать механизм действия РНКи.

Материал подготовлен при участии О.Н. Рыженковой.