

НОВОСТИ НАУКИ

ПОДАВЛЕНИЕ ОНКОГЕНЕЗА

Трансформация нормальных клеток в раковые влечет за собой согласованные изменения экспрессии многих генов. Установив, какие из этих генов являются наиболее важными, можно понять суть механизмов, лежащих в основе злокачественного роста. Трансформация нормальной клетки в раковую включает множественные генетические изменения. В основе этого процесса лежат онкогенные мутации "критических генов", которые ведут к непрерывному пролиферативному процессу и потере чувствительности клеток к сигналам, которые в норме ингибируют рост клеток или стимулируют их гибель [1]. Почти 25 лет тому назад, в журнале "Nature" были опубликованы две выдающиеся работы [2, 3], результаты которых показывают, что воздействие единственного онкогена недостаточно для превращения нормальных клеток в раковые, тогда как согласованное действие 2-х различных онкогенных мутаций может вполне справиться с этой задачей. В работе McMurraу et al. предпринята попытка углубленного исследования генетики онкогенного согласованного действия, результаты которого выявили множество генов, изменение экспрессии которых является важным фактором злокачественного роста. Интригующим обстоятельством является тот факт, что во многих случаях "нормализация" экспрессии хотя бы одного из этих генов достаточна для ослабления опухолевого роста.

McMurraу и соавторы [4] изучали взаимодействие между двумя классическими, распространенными онкогенными мутациями, имеющими место при развитии раковых заболеваний у человека - а именно мутациями белков Ras и p53. Небольшие белки семейства Ras, обладающие GTPазной активностью, представляют собой сигнальные молекулы, которые в норме активируются рецепторами ростового фактора, стимулирующего пролиферацию клеток. Однонуклеотидные замены, которые ведут к существенной активации Ras, обнаруживаются более чем в 30% раковых заболеваний человека [5]. Супрессор опухолей - белок p53 - является транскрипционным фактором, который в норме активируется при различных видах стрессовых состояний, таких как: повреждение ДНК, недостаток кислорода или наличие онкогенов (например, мутантный Ras); в результате, активация супрессора p53 сдерживает пролиферацию клеток и стимулирует запрограммированную гибель клеток (апоптоз). В большинстве раковых заболеваний человека функция p53 нарушается из-за мутаций в самом p53 или в определенных звеньях его сигнального пути [6]. Несмотря на то, что по отдельности онкогенные мутации либо в Ras, либо в p53, оказывают некоторое влияние на превращение нормальных клеток в злокачественные, вместе эти мутации вызывают настоящий "всплеск" злокачественных преобразований, что быстро приводит к стимуляции опухолевого роста [2].

Одна из гипотез, объясняющих онкогенное взаимодействие, заключается в том, что различные онкогенные мутации совместно усиливают экспрессию генов, которые стимулируют образование опухоли, а также подавляют экспрессию тех генов, которые ингибируют этот процесс. Для проверки этой гипотезы, McMurraу и соавторы сравнили профили генной экспрессии в клетках толстой кишки мыши, которые: а) экспрессировали только существенно активный Ras - онкоген; б) только мутантный p53; или в) оба мутанта, Ras и p53. Среди сотен генов, экспрессия которых изменялась с введением этих мутантов совместно или по

одинокке, авторы идентифицировали некую совокупность из 95 генов, которую они назвали "генами согласованного ответа" (ГСО); экспрессия ГСО синергетически повышалась (28 генов) или понижалась (67 генов) под влиянием мутантных Ras и p53.

Для выяснения того, играют ли ГСО решающую роль в поддержании злокачественного фенотипа клеток, экспрессирующих мутанты Ras и p53, авторы произвольно отобрали 24 ГСО и, работая с одним из них в каждом отдельном случае, восстанавливали уровни их экспрессий до уровня, наблюдаемого в нормальных клетках - либо с помощью генной сверхэкспрессии, либо путем интерференции РНК, которая в данном случае играла роль медиатора в истощении генной экспрессии. В качестве контроля авторы также индивидуально нормализовали экспрессию 14-ти так называемых не-ГСО - т.е. генов, чья экспрессия была нарушена либо Ras - мутантом, либо p53, но не под влиянием синергического действия обоих мутантов. Во многих случаях ГСО (в 58%) (общее количество ГСО - 24), восстановление нормальных уровней экспрессии ослабило рост опухоли у мышей. Напротив, только один из 14-ти не-ГСО вел себя аналогичным образом. Таким образом, ГСО, многие из которых впервые рассматриваются в данном исследовании [4] в качестве факторов ракового процесса, вероятно, в очень высокой степени обогащены генами, вовлеченными в процесс стимулирования опухолевого образования.

ГСО, идентифицированные McMurtey и соавторами в клетках толстой кишки мышей, вероятно, играют важную роль и в раковых заболеваниях человека, вызванных, в частности, мутациями Ras и p53. Авторы показали, что больше половины исследованных ГСО обнаруживают аналогично измененную экспрессию в образцах раковых клеток толстой кишки человека. Более того, манипулируя экспрессией нескольких ГСО в раковых клетках толстой кишки человека с мутациями p53 и Ras, также можно вызвать ослабление опухолевого роста в клетках, трансплантируемых затем в организм мыши.

Хотя McMurtey и соавторы показывают, что эффект онкогенного взаимодействия зависит частично от ГСО, вполне возможно, что не-ГСО также играют какую-то ещё неизвестную роль в этом процессе.

ГСО, описанные McMurtey и соавторами, охватывают гены с различными клеточными функциями, включающими проведение сигналов, транскрипцию, апоптоз и клеточный метаболизм. Их данные объясняют с достаточной убедительностью, каким образом несколько онкогенных мутаций в Ras и p53 могут инициировать большие изменения, связанные с раком. Они (мутации) достигают этого, мобилизуя генетические программы, которые координируют многие аспекты клеточной функции - существенные для злокачественной трансформации.

Главная проблема, связанная с пониманием процесса формирования опухоли, состоит в определении количества генов, реально участвующих в данном процессе. Если результаты данного исследования [4] могут быть обобщены, то вполне вероятно, что каждый из сотен генов вносит вклад в фенотип рака. Сложные изменения, наблюдаемые в опухолевых геномах [7], и данные [8] о том, что мутации почти в 20% генов, кодирующих киназы, вносят, по-видимому, свой вклад в онкогенные состояния - все это подтверждает вероятность такого предположения. Учитывая предельное переключение генетических сетей в опухолях, в настоящее время нельзя логически предсказать, какие гены (онкогены и не-онкогены) [9, 10] будут вносить существенно важный вклад в развитие опухоли с тем, чтобы использовать их в качестве мишеней для лекарственных препаратов. В то время как онкогены можно идентифицировать путем геномного анализа, обнаружение "зависимости" опухолей от не-онкогенов потребует альтернативных подходов. Вполне вероятно, что использование таких подходов, как сверхэкспрессия или ослабленная экспрессия, направленных на выяснение зависимости, которым подвергаются раковые клетки либо путем тестирования генов-кандидатов (как это показали McMurtey и др.), либо путем геномного

скрининга - окажется наиболее целесообразным способом разрушения уязвимых участков раковых клеток для борьбы с ними с помощью современных терапевтических методов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Hanahan D., Weinberg R.A.* (2000) *Cell*, **100**, 57-70.
2. *Land H., Parada L.F., Weinberg R.A.* (1983) *Nature*, **304**, 596-602.
3. *Ruley H.E.* (1983) *Nature*, **304**, 602-606.
4. *McMurray H.R., Sampson E.R., Compitello G., Kinsey C., Newman L., Smith B., Chen S.R., Klebanov L., Salzman P., Yakovlev A., Land H.* (2008) *Nature*, **453**, 1112-1116.
5. *Downward J.* (2003) *Nature Rev. Cancer*, **3**, 11-22.
6. *Toledo F., Wahl G.M.* (2006) *Nature Rev. Cancer*, **6**, 909-923.
7. *Wood L.D., Parsons D.W., Jones S., Lin J., Sjoblom T., Leary R.J., Shen D., Boca S.M., Barber T., Ptak J., Silliman N., Szabo S., Dezso Z., Ustyanksky V., Nikolskaya T., Nikolsky Y., Karchin R., Wilson P.A., Kaminker J.S., Zhang Z., Croshaw R., Willis J., Dawson D., Shipitsin M., Willson J., Sukumar S., Polyak K., Park B.H., Pethiyagoda C.L., Pant P.V., Ballinger D.G., Sparks A.B., Hartigan J., Smith D.R., Suh E., Papadopoulos N., Buckhaults P., Markowitz S.D., Parmigiani G., Kinzler K.W., Velculescu V.E., Vogelstein B.* (2007) *Science*, **318**, 1108-1113
8. *Greenman C., Stephens P., Smith R., Dalgliesh G.L., Hunter C., Bignell G., Davies H., Teague J., Butler A., Stevens C., Edkins S., O'Meara S., Vastrik I., Schmidt E.E., Avis T., Barthorpe S., Bhamra G., Buck G., Choudhury B., Clements J., Cole J., Dicks E., Forbes S., Gray K., Halliday K., Harrison R., Hills K., Hinton J., Jenkinson A., Jones D., Menzies A., Mironenko T., Perry J., Raine K., Richardson D., Shepherd R., Small A., Tofts C., Varian J., Webb T., West S., Widaa S., Yates A., Cahill D.P., Louis D.N., Goldstraw P., Nicholson A.G., Brasseur F., Looijenga L., Weber B.L., Chiew Y.-E., Fazio A., Greaves M.F., Green A.R., Campbell P., Birney E., Easton D.F., Chenevix-Trench G., Tan M.-H., Khoo S.K., Teh B.T., Yuen S.T., Leung S.Y., Wooster R., Futreal P. A. and Stratton M.R.* (2007) *Nature*, **446**, 153-158
9. *Weinstein I.B., Joe A.K.* (2006) *Nature Clin. Pract. Oncol.*, **3**, 448-457.
10. *Solimini N.L., Luo J., Elledge S.J.* (2007) *Cell*, **130**, 986-988.

По материалам журнала "Nature" при участии Григорян Е.А.

ПЕРСОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА

Комплементарные пары оснований нуклеиновых кислот Джеймса Уотсона.

Мы уже рассказывали о секвенировании генома первооткрывателя ДНК Джеймса Уотсона (Биомедицинская химия, том 54, стр. 278-280). Для секвенирования 6 миллиардов пар оснований потребовалось только четыре месяца, небольшая группа ученых и 1,5 миллионов долларов.

В апрельском номере журнала *Nature* (том 452, стр. 872-876) напечатано сообщение Wheeler и соавторов "The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing", которое стало своеобразным продолжением научного труда Джеймса Уотсона и Фрэнсиса Крика [1], опубликованного 55 лет назад, в котором авторы впервые предложили двухспиральную структуру ДНК.

В "информационном" ядре той красивой структуры, оказавшей огромное влияние на будущее перспективное развитие биологии и медицины, находятся пары оснований, открытые Уотсоном путем подбора картонных аппликаций оснований аденина, тимина, гуанина и цитозина. Wheeler и соавторы описали использование массивно-параллельного секвенирования ДНК уже для определения порядка пар оснований в геноме самого Уотсона. Это достижение - настоящий технологический прорыв, который открывает возможность рутинного использования секвенирования целого генома в качестве основного метода исследования в генетике человека. Учитывая тот факт, что в качестве исследуемого объекта выбран геном Джеймса Уотсона, Нобелевского лауреата и одного из первооткрывателей структуры ДНК, авторы работы объявили о реальном приближении эры "персональной геномики", и, с согласия известного генетика, сделали результаты секвенирования его генома достоянием общественности.

С технической точки зрения, значение публикации заключается в том, что авторы полностью полагаются на секвенирующую платформу ДНК, значительно отличающуюся от той, которая была использована во время первой великой эры секвенирования генома, кульминационным моментом которой стал проект "Геном человека" (Human Genome Project). В платформе HGP каждый фрагмент в тысячу пар оснований геномной ДНК был использован с применением технологий рекомбинантной ДНК. Исследователи HGP обработали десятки миллионов индивидуальных образцов на пути к определению последовательности 3 миллиардов пар оснований, присутствующих в отдельном фрагменте генома человека, чтобы достичь необходимой избыточности в каждой зоне нуклеотидной последовательности. Такие исследования потребовали развития геномных центров промышленного масштаба, которые выглядели, как промышленные заводы, нежели просто лаборатории. Только затраты на получение данных составили сотни миллионов долларов.

Wheeler и соавторы [2] использовали одну из нескольких новых ДНК-секвенирующих платформ, которые могут достигать почти такого же результата с затратами в 1 % от всей стоимости [3,4]. Следует отметить, что на сегодняшней стадии развития ни один из этих методов не мог бы позволить простое, недорогое воспроизведение HGP: анализ данных по-прежнему всецело зависит от высококачественной "эталонной" последовательности, секвенированной в ходе этого проекта. Для увеличения эффективности новых методов необходима массивная параллелизация биохимических и измерительных операций. Средства, используемые Wheeler, поставляются на рынок подразделением Roche Diagnostics - 454 Life Sciences, которая секвенировала геном Джеймса Уотсона совместно с Human Genome Sequencing Center (Baylor College of Medicine, США).

Приборы 454 Life Sciences достигают массивной параллелизации двумя различными способами [5]. На первом этапе отдельные молекулы ДНК прикрепляют к синтетическим "бусинкам". В процессе амплификации "бусинки" попадают в крошечные капельки воды внутри водомасляной эмульсии; поэтому параллельно в одной пробирке могут быть обработаны более 100000 образцов. На более позднем этапе, во время которого производятся оптические измерения для сбора фактических данных секвенирования, каждая "бусинка" удерживается в пиколитровом резервуаре, вытравленном стекловолоске внутри волоконно-оптического пучка. Хотя затраты пока не достигли столь разрекламированной стоимости исследования в 1000 долларов за геном [6], они все-таки достаточно низкие, и эра "персональной геномики" становится реальностью.

Что можно ожидать от секвенирования индивидуальных геномов? Исследования Wheeler и соавторов, главным образом, показали, что, с медицинской и биологической точки зрения, будет чрезвычайно трудно выстроить достоверные гипотезы на основе индивидуальных последовательностей. Рассмотрим проблему интерпретации единичных нуклеотидных полиморфизмов

(SNP) Джеймса Уотсона. По данным Wheeler, в геноме Уотсона выявлены около 3300000 SNP в сравнении с эталонной последовательностью HGP. 82 % из этих SNP уже описаны у других индивидуумов, в результате чего можно предположить, что общественные базы данных имеют хорошее представление об обычных SNPs. Предполагают, что большинство этих вариантов нейтральные, то есть не имеют эволюционного или функционального значения.

Однако ученые прогнозируют, что некоторые из 11000 SNP Джеймса Уотсона (85% ранее известных, 15% новых), вероятно, влияют на аминокислотную последовательность и, возможно, функцию белков. Неизвестное количество дополнительных SNP, несомненно, влияет на регулирование функций белков. Поскольку у человека только около 20000 генов, кодирующих белки, при детальном сравнении белков двух любых индивидуумов можно найти множество отличий.

Уровень и полная модель вариаций в геноме Уотсона представляются типичными для вариативного ряда у других индивидуумов, преимущественно у европейцев. Частично, это заключение основывается на другом примере секвенирования персонального генома Вентера, который возглавлял Celera Genomics в конкурентной борьбе с HGP по производству первой последовательности генома человека. В начале сентября 2007 года Вентер опубликовал собственный, почти полностью секвенированный геном, что вызвало сравнительно небольшой интерес [7], поскольку в проекте использовались методы HGP и многие данные уже были обнародованы. Тем не менее, одинаковая общая статистика для этих двух персональных геномов способствует утверждению новых методов, применяемых Wheeler и коллегами.

Последовательность Уотсона демонстрирует, что он - носитель ряда мутаций, которые могли бы вызвать определённый интерес у специалиста-генетика. Однако на сегодняшний день влияние этих мутаций непосредственно на самого Уотсона неизвестно, и потомство могло оказаться в группе риска только в самом маловероятном случае брака между двумя "переносчиками". Ни одна из этих мутаций, вероятно, никогда не будет рассмотрена в качестве соответствующего кандидата для скрининга в общей популяции, представителем которой выступает Уотсон.

Признание слабой клинической ценности этой последовательности может заставить некоторых инвесторов приостановить разработку новых методов секвенирования, учитывая, что главные капиталовложения, необходимые для коммерциализации этих технологий, были, скорее, продиктованы ожидаемым потенциалом и перспективами в медицине, нежели их применением в научных исследованиях.

Основная часть ученых, по-видимому, с энтузиазмом встретит работу Wheeler и его коллег, а также новую провозглашенную эру "персональной геномики". Теперь главная задача в области генетики человека - изучить корреляции генотипа с фенотипом, уделив особое внимание предрасположенности к тому или иному заболеванию и реакции пациента на терапию. Секвенирование целого генома методом "случай-контроль" в популяциях - привлекательная альтернатива методам, которым генетики доверяют последние 25 лет и которые часто зависят от признанных предположений о том, какие гены секвенировать у индивидуумов со специфическими фенотипами. Они также пытаются обнаружить наследование фенотипа в семьях или среди тех индивидуумов, которые эволюционно родственны по "генетическим маркерам" (нейтральные варианты ДНК, которые могут выявить общую родословную локальных сегментов (участков) генома). В этих косвенных ассоциативных методах наблюдаемые генетические маркеры могут указывать приблизительное геномное положение неизвестных функциональных вариантов, влияющих на фенотип. Все варианты, включая функционально важные, будут тщательно изучать с наступлением эры повторного секвенирования целого генома.

В действительности практика персонифицированной медицины, основанной на геномных последовательностях, "должна подождать", пока ученые на основе полученных данных смогут давать надежные прогнозы. В настоящее время такой возможности пока нет. Если взять простой пример какой-либо особенной наследственной черты, ученые пока не смогли бы даже предсказать рост Уотсона по его геномной последовательности: наиболее информативные известные SNPs, влияющие на рост человека, составляют только несколько миллиметров вариаций для наследственной, врожденной особенности, стандартное отклонение которой - 7 сантиметров [8].

Символическое значение работы Wheeler и коллег [2] значительно важнее, чем непосредственный "немедленный" вклад в биологию. Однако нельзя не сказать о ценности полученных данных. Джеймс Уотсон - блестящий ученый. Он создал прочный фундамент геномной биологии, его лидерские и личностные качества, сила индивидуальности во многом повлияли на стабильное развитие и продуктивное состояние современной науки. Будущие историки в своих исследованиях, скорее, будут полагаться на работы Уотсона, его высказывания, жизненные поступки, чем на порядок пар оснований в его геноме.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Watson J.D., Crick F.H. (1953) Nature, 171, 737-738.*
2. *Wheeler D.A., Srinivasan M., Egholm M., Shen Y., Chen L., McGuire A., He W., Chen Y-J, Makhijani V, Roth G.T., Gomes X., Tartaro K., Niazi F., Turcotte C.L., Irzyk G.P., Lupski J.R., Chinault C., Song X., Liu Y., Yuan Y., Nazareth L., Qin X., Muzny D.M., Margulies M., Weinstock G.M., Gibbs R.A., Rothberg J.M. (2008) Nature, 452, 872-876.*
3. *Bentley D.R. (2006) Curr. Opin. Genet. Dev., 16, 545-552.*
4. *Shendure J., Mitra R.D., Varma C., Church G.M. (2004) Nature Rev. Genet., 5, 335-344*
5. *Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y-J., Chen Z., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer I.M.L., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J-B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makhijani V.B., McDade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomasz A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M.P., Yu P., Begley R.F., Rothberg J.M. (2005) Nature, 437, 376-380.*
6. *Collins F.S., Green E.D., Guttmacher A.E., Guyer M.S. (2003) Nature, 422, 835-847.*
7. *Levy S., Sutton G., Ng P.C., Feuk L., Halpern A.L., Walenz B.P., Axelrod N., Huang J., Kirkness E.F., Denisov G., Lin Y., MacDonald J.R., Pang A.W.C., Shago M., Stockwell T.B., Tsiamouri A., Bafna V., Bansal V., Kravitz S.A., Busam D.A., Beeson K.Y., McIntosh T.C., Remington K.A., Abril J.F., Gill J., Borman J., Rogers Y-H., Frazier M.E., Scherer S.W., Strausberg R.L., Venter J.C. (2007) Plos Biol, 5, e254-e286.*
8. *Weedon M.N., Lettre G., Freathy R.M., Lindgren C.M., Voight B.F., Perry J.R.B., Elliott K.S., Hackett R., Guiducci C., Shields B., Zeggini E., Lango H., Lyssenko V., Timpson N.J., Burt N.P., Rayner N.W., Saxena R., Ardlie K., Tobias J.H., Ness A.R., Ring S.M., Palmer C.N.A., Morris A.D., Peltonen L., Salomaa V., Smith G.D., Groop L.C., Hattersley A.T., McCarthy M.I., Hirschhorn J.N., Frayling T.M. (2007) Nature Genet., 39, 1245-1250.*

По материалам журнала "Nature" при участии Рыженковой О.Н.