

1 – НОЦ «Нанотехнологии»,
ФГАОУ ВПО
«Российский университет
дружбы народов»,
117198, Россия, г. Москва,
ул. Миклухо-Маклая, 6

2 – ФГБН Институт
биоорганической химии
им. академиков
М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН), 117871,
Россия, Москва,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10

1 – Peoples' Friendship
University of Russia, 6,
Miklukho-Maklaya str.,
Moscow, 117198, Russia

2 – M.M. Shemyakin –
Yu.A. Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry of
the Russian Academy
of Sciences, 16/10,
Miklukho-Maklaya str.,
Moscow, 117871, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: stanyar@yandex.ru
Тел.: 8 (499) 936 85 99

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОТЕОМНЫХ БИОНАНОСИСТЕМ В ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

И.Е. Станишевская^{1*}, М.Ю. Кордюкова², Н.М. Владимирова²,
А.А. Миронова², Я.М. Станишевский¹, О.В. Зацепина²

Резюме. Ядрышковые белки представляют собой уникальную протеомную бионаносистему, включающую группу внутриклеточных белков у млекопитающих и человека. Их изучение способствует решению многих научно-практических задач, от выяснения механизмов регуляции биогенеза рибосом в опухолевых клетках до разработки инновационных способов генотерапии рака и тестирования противоопухолевых средств. Применение протеомных бионаносистем позволит сформулировать новые подходы к персонализации лечения онкобольных, и обеспечить условия для снижения стоимости оказания им эффективной медицинской помощи.

Ключевые слова: протеомные бионаносистемы, ядрышковые белки, биогенез, онкология, генотерапия, персонализированная медицина.

PROSPECTS OF PROTEOMIC BIONANOSYSTEMS IN PERSONALIZED MEDICINE

I.E. Stanishevskaya^{1*}, M.Y. Kordyukova², N.M. Vladimirova², A.A. Mironova², Ya.M. Stanishevskiy¹, O.V. Zatsepina²

Abstract. Nucleolar proteins are unique proteomic bionanosystem that includes a group of intracellular proteins in mammals and man, their study contributes to the solution of many scientific and practical problems of elucidating the mechanisms of regulation of ribosome biogenesis in tumor cells to develop innovative methods of gene therapy of cancer and testing of anticancer agents. Application of proteomic bionanosystem allows us to elaborate new approaches for personalized anti-cancer therapy, as well as to provide conditions for reducing the cost of providing them with effective medical care.

Keywords: proteomic bionanosystems, nucleolar proteins, biogenesis, oncology, gene therapy, personalized medicine.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наиболее перспективные направления современной медицины связаны с бурным развитием нанотехнологии. Одним из актуальных подходов к повышению эффективности профилактики и лекарственной терапии является ранняя иммунодиагностика и прогностическая оценка течения онкозаболеваний различной нозологии у человека и генотерапия рака. В 2013 г. журнал «Science» назвал главным прорывом в научной медицине иммунотерапию рака, а журнал «Nature» особо отметил исследования в области генотерапии¹. В 2014 г. Российский научный фонд включил в перечень приоритетных направлений исследования в области персонализированной медицины, базирующейся на геномной медицине и иммунотерапии.

По мнению многих ученых, генотерапия – одно из самых перспективных направлений в современной медицинской на-

уке для лечения многих наследственных и других неизлечимых на сегодняшний день заболеваний, включая многие формы злокачественных новообразований – солидные опухоли и заболевания кроветворной системы. По социальной значимости научных исследований в генотерапии лидируют онкологические заболевания и аутоиммунные заболевания. [9, 24, 25, 33, 35, 39]. Все это делает работы в этом направлении важными и актуальными.

ИЗУЧЕНИЕ ЯДРЫШКОВЫХ БЕЛКОВ

Лаборатория структурной биохимии ФГБН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) под руководством д.б.н., профессора Зацепиной О.В. проводит фундаментальные исследования по изучению ядрышковых белков, участвующих в биогенезе

¹ Журнал «Science» назвал научным прорывом 2013 года иммунотерапию рака; российский ученый попал в «десятку года» по версии журнала «Nature». URL: <http://ria.ru/studies/20131219/985278301>, <http://www.klerk.ru/boss/articles/350119/> (дата обращения 23.01.2015).

рибосом, регуляции клеточного цикла и апоптоза у человека и млекопитающих.

Изучение белков ядрышка человека, используемых в качестве маркеров пролиферации опухолевых клеток, индикаторов эффективности противоопухолевых препаратов *in vitro* и потенциальных мишеней в генотерапии рака, направлено на расширение исследований в области диагностики, прогностической оценки течения социально значимых заболеваний и будет способствовать развитию персонализированной медицины в нашей стране. Изучение роли ключевых ядрышковых белков человека в регуляции пролиферации опухолевых клеток и их ответе на действие супрессоров метаболизма, вызывающих клеточную гибель, позволит разработать новые подходы к клинико-лабораторной диагностике тех вариантов новообразований, которые трудно диагностируются традиционными способами. Решение вышеописанных задач направлено на выявление различий (включая скорость роста малигнизированных клеток и их возможную резистентность к используемым химиотерапевтическим препаратам) между новообразованиями одной нозологии, но развивающихся у разных больных. А идентификация ядрышковых белков – регуляторов пролиферации опухолевых клеток позволит выявить новые мишени для генотерапии рака и создать плазмидные конструкции, кодирующие белковые мишени и обеспечивающие их адресную доставку в опухолевые клетки [5, 7–9, 11, 24, 39].

Оценка пролиферативной активности опухолевых клеток при онкологических заболеваниях является одним из важных показателей в диагностике варианта заболевания, прогнозирования скорости опухолевого роста и выбора адекватного курса лечения. Активация клеток млекопитающих к пролиферации сопровождается увеличением содержания многих ядерных и ядрышковых белков. К ключевым ядрышковым белкам относят белки, которые не только участвуют в разных стадиях биогенеза рибосом, но и вовлечены в регуляцию других жизненно важных клеточных процессов, включая пролиферацию и апоптоз. Важнейшим свойством таких белков, отличающих их от ядерных (нуклеоплазматических) белков, является высокая мобильность, т.е. способность изменять локализации при действии различных ингибиторов клеточного метаболизма, многие из которых используются в химиотерапии опухолей. В совокупности это позволяет рассматривать ядрышковые белки как потенциальные мишени в генотерапии рака и маркеры эффективности действия новых химиотерапевтических средств на опухолевые клетки *in vitro*. К наиболее важным и лабильным белкам ядрышек клеток млекопитающих и человека относятся нуклеофозмин (NPM1), фибрилларин (FBL) и SURF6. Эти белки являются жизненно необходимыми и многофункциональными фактора-

ми процессинга рРНК, содержание которых повышено при многих вариантах злокачественных новообразований и в активно пролиферирующих клетках [1–4, 6, 10]. Однако их точная роль в регуляции клеточной пролиферации, а также возможность использования в качестве мишеней в генотерапии рака и реакция на действие многих метаболических ингибиторов (химиотерапевтических препаратов) до сих пор остаются невыясненными.

Изучение протеома и функций ядрышка, как основного структурного и функционального домена клеток эукариот, в настоящее время активно развивается, о чем свидетельствует огромное количество оригинальных статей и многочисленных обзоров, опубликованных в этой области за последние годы [17, 22, 27, 33, 45]. Интерес к изучению ядрышка связан не только с его ключевой ролью в снабжении эукариотических клеток рибосомами, но и с особенностями состояния и характером экспрессии многих ядрышковых белков в опухолевых клетках [18, 25, 35]. Кроме того, показано, что ядрышковый аппарат принимает участие в патогенезе других заболеваний человека, включая нейродегенеративные и аутоиммунные болезни [26, 29, 33], в развитии вирусных инфекций [38, 43], оо- и эмбриогенезе [31]. Давно известно также, что уровень экспрессии многих белков ядрышка повышен в опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками и отражает способность раковых клеток к активной пролиферации [19, 36]. Гены, кодирующие белки ядрышка и рибосом, подвергаются частым мутациям, что является причиной повышенного содержания этих белков или нарушений в их первичной структуре при многих патологиях, включая злокачественную трансформацию клеток [30, 32]. У больных онкологическими заболеваниями одной нозологии (например, при лимфопролиферативных онкологиях) описаны различия в уровне экспрессии одних и тех же ядрышковых белков, которые участвуют в клеточной пролиферации [13, 15, 20, 46]. Эти наблюдения прямо указывают на то, что характер экспрессии и состояние ядрышковых белков могут быть положены в основу разработки новых подходов в персонализированной медицине онкологических болезней. Принимая во внимание, что белки ядрышка жизненно необходимы для опухолевых клеток, все чаще высказываются предположения о том, что они могут быть также перспективными мишенями в генотерапии рака [21, 40, 42]. И наконец, установлено, что белки ядрышка, в отличие от других внутриклеточных белков, обладают особой «чувствительностью» к ингибиторам клеточного метаболизма, влияющим на транскрипцию, трансляцию, репликацию, репарацию и активность внутриклеточных киназ [13, 14, 16, 25]. Лабильность ядрышковых белков, в частности, выражается в изменении их локализации под действием стресса и часто является специфичной для того или иного воздействия. Поэтому реакция ядрыш-

ковых белков на действие ингибиторов клеточного метаболизма может быть использована для выяснения механизмов действия и идентификации мишеней новых противоопухолевых средств простыми и экономичными методами клеточной биологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ядрышковые белки представляют собой уникальную протеомную бионаносистему, включающую группу внутриклеточных белков у млекопитающих и человека. Исследование таких бионаносистем будет способствовать решению многих научно-практических задач, от выяснения механизмов регуляции биогенеза рибосом в опухолевых клетках до разработки инновационных способов генотерапии рака и тестирования противоопухолевых средств.

Изучение протеомных бионаносистем позволит сформулировать новые подходы к персонализации лечения онкобольных, а также обеспечить условия для снижения стоимости оказания им эффективной медицинской помощи.

ЛИТЕРАТУРА

1. В.В. Барыгина, А.А. Миронова, О.В. Зацепина. Параметры, влияющие на оценку подвижности белков ядрышка в живых клетках методом FRAP на примере белка фибрилларина // Цитология. 2012. Т. 54. № 1. С. 17–24.
2. М.Ю. Кордюкова, О.В. Зацепина, М.А. Ползиков. Клонирование, экспрессия и выделение из *Escherichia coli* белка человека SURF-6, транскрипционно слитого с глутатион-S-трансферазой // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 2. С. 141–145.
3. М.Ю. Кордюкова, М.А. Ползиков, К.В. Шишова, О.В. Зацепина. Анализ белковых партнеров белка ядрышка человека SURF6 в клетках HeLa методом аффинной адсорбции // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 4. С. 1–12.
4. М.Ю. Кордюкова, М.А. Ползиков, К.В. Шишова, О.В. Зацепина. Функциональное значение белка ядрышка SURF6 человека – ключевого белка одноименного семейства эукариот // Доклады академии наук. 2014. Т. 455. № 4. С. 1–3.
5. М.С. Красильщикова, В.П. Леонов, О.В. Зацепина, В.И. Дейгин. Исследование иммуносупрессорных свойств «Тимодепрессина» в экспериментальной модели аутоиммунных заболеваний // Иммунология. 2009. Т. 30. № 5. С. 290–294.
6. К.В. Шишова, О.О. Жарская, О.В. Зацепина. Судьба ядрышка в митозе: сравнительный анализ локализации некоторых форм пре-рРНК методом флуоресцентной гибридизации *in situ* в фибробластах мыши NIH/3T3 // ACTA NATURAE. 2011. Т. 3. С. 91–97.
7. A. Arefieva, M. Krasilshchikova, O. Zatsepina. Immune Complex Deposits as a Characteristic Feature of Mercury-Induced SLE-Like Autoimmune Process in Inbred and Outbred Mice // Autoimmune Diseases – Contributing Factors, Specific Cases of Autoimmune Diseases, and Stem Cell and Other Therapies. – Croatia: inTech. 2012. P. 119-150 (Chapter 6).
8. M. Costanzo, B. Cisterna, O.O. Zharskaya, O.V. Zatsepina, M. Biggiogera. Discrete foci containing RNase A are found in nucleoli of HeLa cells aged in culture // Eur. J. Histochem. 2011. V. 55. P. 82–84.
9. M. Kordyukova, M. Polzikov, K. Shishova, J.J. Diaz, O. Zatsepina. The human nucleolar protein SURF6 affects degradation of the pre-rRNA internal transcribed spacers and interacts with a number of rRNA processing factors // FEBS J. 2013. V. 280. P. 475–476.
10. M. Polzikov, M. Kordyukova, L. Zavalishina, C. Magoulas, O. Zatsepina. Development of novel mouse hybridomas producing monoclonal antibodies to human and mouse nucleolar protein SURF-6 // Hybridoma. 2012. V. 31. № 1. P. 48–53.
11. M. Polzikov, S. Yakovenko, J. Voznesenskaya, M. Troshina, O. Zatsepina. Overexpression of ribosomal RNA in cumulus cells of patients with polycystic ovary syndrome // J. Assist. Reprod. Genet. 2012. V. 29. № 10. P. 1141–1145.
12. М.В. Малышева, А.А. Григорьев, Т.И. Булычева, О.В. Зацепина. Повышенная чувствительность ядрышек пролиферирующих клеток человека к ингибированию синтеза белка анизомицином // Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. 2010. Т. 150. С. 223–227.
13. М.В. Малышева, А.А. Моралева, Н.Л. Дейнеко, Т.И. Булычева, О.В. Зацепина. Сравнительный анализ экспрессии ключевых белков ядрышка в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров, активированных к пролиферации *in vitro* // Иммунология. 2010. Т. 31. С. 13–17.
14. G. Antoniali, L. Lirussi, M. Poletto, G. Tell. Emerging roles of the nucleolus in regulating the DNA damage response: the noncanonical DNA repair enzyme APE1/Ref-1 as a paradigmatical example // Antioxid Redox Signal. 2014. V. 20. P. 621–639.
15. K.C. Arden, D.A. Johnston, A. Cork, S. Pathak. Differential nucleolus organizer activity in normal and leukemic bone marrow // Am. J. Hematol. 1989. T. 30. С. 164–173.
16. S. Boulon, B.J. Westman, S. Hutten, F.M. Boisvert, A.I. Lamond. The nucleolus under stress // Mol Cell. 2010. V. 40. P. 216–227.

17. B. Cisterna, M. Biggiogera. Ribosome biogenesis: from structure to dynamics // *Int Rev Cell Mol Biol*. 2010. V. 284. P. 67–111.
18. C. Deisenroth, Y. Zhang. Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway // *Oncogene*. 2010. V. 29. P. 4253–4260.
19. M. Derenzini, L. Montanaro, D. Treré. What the nucleolus says to a tumour pathologist // *Histopathology*. 2012. V. 54. P. 753–762.
20. N.N. Dergunova, T.I. Bulycheva, E.G. Artemenko, A.P. Shpakova, A.N. Pegova, E.G. Gemjian, O.A. Dudnik, O.V. Zatssepina, O.S. Malashenko. A major nucleolar protein B23 as a marker of proliferation activity of human peripheral lymphocytes // *Immunology Letters*. 2002. V. 83. P. 67–72.
21. D. Drygin, W.G. Rice, I. Grummt. The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010. V. 50. P. 131–156.
22. M. Dunder. Nuclear bodies: multifunctional companions of the genome // *Curr Opin Cell Biol*. 2012. V. 24. P. 415–422.
23. E. Emmott, J.A. Hiscox. Nucleolar targeting: the hub of the matter // *EMBO Rep*. 2009. V. 10. P. 231–238.
24. S.R. Ellis. Nucleolar stress in Diamond Blackfan anemia pathophysiology // *Biochim Biophys Acta*. 2014. V. 1842. P. 765–768.
25. I. Grummt. The nucleolus – guardian of cellular homeostasis and genome integrity // *Chromosoma*. 2013. V. 122. P. 487–497.
26. N. Hariharan, M. Sussman. Stressing on the nucleolus in cardiovascular disease // *Biochim Biophys Acta*. 2014. V. 1842. P. 798–801.
27. D. Hernandez-Verdun, P. Roussel, M. Thiry, V. Sirri, D. Lafontaine. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2010. V. 1. P. 415–431.
28. D. Hernandez-Verdun. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle // *Nucleus*. 2011. V. 2. P. 189–194.
29. M. Hetman, M. Pietrzak. Emerging roles of the neuronal nucleolus // *Trends Neurosci*. 2012. V. 35. P. 305–314.
30. K. Karbstein. Quality control mechanisms during ribosome maturation // *Trends Cell Biol*. 2013. V. 23. P. 242–250.
31. H. Kyogoku, S. Ogushi, T. Miyano. Nucleoli from Two-Cell Embryos Support the Development of Eucleolated Germinal Vesicle Oocytes in the Pig // *Biol Reprod*. 2012. V. 87. P. 113–116.
32. A. de Las Heras-Rubio, L. Perucho, R. Paciucci, J. Vilardell, M.E. Lleonart. Ribosomal proteins as novel players in tumorigenesis // *Cancer Metastasis Rev*. *Cancer Metastasis Rev*. 2014. V. 33. P. 115–141.
33. J. Lee, Y.J. Hwang, H. Ryu, N.W. Kowall, H. Ryu. Nucleolar dysfunction in Huntington's disease // *Biochim Biophys Acta*. 2014. V. 1842. P. 785–790.
34. L.W. Lee, C.C. Lee, C.R. Huang, S.J. Lo. The nucleolus of *Caenorhabditis elegans* // *J. Biomed Biotechnol*. 2012. V. 19. P. 1–11.
35. L.B. Maggi (jr.), C.L. Winkeler, A.P. Miceli, A.J. Apicelli, S.N. Brady, M.J. Kuchenreuther, J.D. Weber. ARF tumor suppression in the nucleolus // *Biochim Biophys Acta*. 2014. V. 1842. P. 831–839.
36. L. Montanaro, D. Treré, M. Derenzini. Nucleolus, ribosomes, and cancer // *Am J Pathol*. 2008. V. 173. P. 301–310.
37. A. Németh, G. Längst. Genome organization in and around the nucleolus // *Trends Genet*. 2011. V. 27. P. 149–156.
38. L. Ni, S. Wang, C. Zheng. The nucleolus and herpesviral usurpation // *J Med Microbiol*. 2012. V. 61. P. 1637–1643.
39. R. Parlato, G. Kreiner. Nucleolar activity in neurodegenerative diseases: a missing piece of the puzzle? // *J Mol Med (Berl)*. 2013. V. 91. P. 541–547.
40. A.J. Pickard, U. Bierbach. The cell's nucleolus: an emerging target for chemotherapeutic intervention // *ChemMedChem*. 2013. V. 8. P. 1441–1449.
41. D. Ruggero. Revisiting the nucleolus: from marker to dynamic integrator of cancer signaling // *Sci Signal*. 2012. V. 5. P. 38.
42. J.E. Quin, J.R. Devlin, D. Cameron, K.M. Hannan, R.B. Pearson, R.D. Hannan. Targeting the nucleolus for cancer intervention // *Biochim Biophys Acta*. 2014. V. 1842(6). P. 802–816.
43. A. Salvetti, A. Greco. Viruses and the nucleolus: The fatal attraction // *Biochim Biophys Acta*. 2014. V. 1842. P. 840–847.
44. P. Shaw, J. Brown. Nucleoli: composition, function, and dynamics // *Plant Physiology*. 2012. V. 158. P. 44–51.
45. J. Padeken, P. Heun. Nucleolus and nuclear periphery: Velcro for heterochromatin // *Curr Opin Cell Biol*. 2014. V. 28. P. 54–60.
46. D. Trere, A. Ceccarelli, M. Danova, M. Derenzini. *In vivo* bromodeoxyuridine labelling index, AgNOR protein expression and DNA content in human tumours // *Eur J Histochem*. 1996. V. 40. P. 17–26.