

**ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДЕФЕКТНОГО ГЕНА delF508 МУКОВИСЦИДОЗА
ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ГЕННОГО БИОСИНТЕЗА «ДВУМЕРНЫМ ГЕНОМ»
КРИСТАЛЛОВ МОНТМОРИЛОНИТА**

С. В. Буряченко

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, кафедра биохимии, лаборатория клеточной биохимии, Украина, г. Харьков, пл. Свободы, 4, 61022, +380950072469, semenb837@gmail.com

Резюме

Представлены экспериментальные данные по восстановлению дефектного гена delF508 муковисцидоза (МВ) (кистозный фиброз поджелудочной железы) - наиболее распространенного, тяжелого моногенного заболевания, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу. Частота заболевания в разных популяциях, нациях и этнических группах существенно варьирует, составляя в среднем 1 : 2-2,5 тыс. новорожденных у представителей белой расы. По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения в мире ежегодно рождается 45-50 тыс. детей с МВ, а число гетерозиготных носителей заболевания насчитывает многие десятки миллионов. У представителей черной расы частота МВ в среднем ниже и составляет 1 : 9 - 10 тыс. новорожденных, а у желтой расы данное заболевание встречается еще реже (Goodchild, Dodge, 1987). Наше внимание привлекает возможность генотерапии этого заболевания, в частности, методы генноинженерного лечения МВ. Успешное создание модели МВ на лабораторных крысах позволило получить положительные результаты о полном восстановлении мутированного дефектного гена delF508 с использованием «двумерных генов» кембрийских глин.

Ключевые слова: муковисцидоз, ген delF508, генотерапия, двумерный ген глины.

Восстановление дефектного гена delF508

Введение. Муковисцидоз (кистозный фиброз поджелудочной железы) — системное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, поражающее экзокринные железы организма; встречается с частотой 1:2000—

1:2500 новорожденных. В основе заболевания лежит генная мутация. Если оба родителя гетерозиготны, риск рождения в семье больного муковисцидозом ребенка равняется 25 %. Частота гетерозиготного носительства составляет 2—5 %. В 1989 г. была расшифрована структура гена, ответственного за синтез белка, получившего название МВТР (трансмембранный регулятор муковисцидоза). Этот белок регулирует транспорт электролитов (главным образом хлора) через мембрану клеток, выстилающих выводные протоки экзокринных желез. Генная мутация приводит к нарушению структуры и функции синтезируемого белка, в результате чего секрет, выделяемый этими железами, становится чрезмерно густым и вязким. При этом страдают легкие, желудочно-кишечный тракт, поджелудочная железа. Сущность мутации заключается в выпадении триплета, кодирующего аминокислоту фенилаланин. Вследствие этого дефекта молекула МВТР утрачивает аминокислотный остаток в позиции 508 (поэтому данная мутация была названа дельта-508). Это только одна из мутаций, приводящих к развитию муковисцидоза; к настоящему времени их известно уже более 120. Многообразие клинической картины заболевания можно объяснить большим числом мутаций, его обуславливающих. Нашей целью является проведение эксперимента по восстановлению структуры и функции синтезируемого трансмембранного CFTR белка, прекращению генной мутации в гене *delF508*, восстановлению аминокислотного остатка молекулы МВТР, восстановлению выделению секрета экзокринных желез. Нами был предложен метод восстановления триплета аминокислоты фенилаланин в позиции 508 с помощью кристаллов монтмориллонита глины кембрийского периода на экспериментальной модели лабораторных крыс с воспроизведенным врожденным муковисцидозом.

Материалы и методы. В качестве экспериментальной модели для воспроизведения муковисцидоза были взяты крысы линии Вистар. Эксперименты проводили параллельно на опытных и контрольных животных – белых крысах самцах линии Вистар в возрасте 1, 3, 12, 24 месяца. Вводился с пищей опытной группе животных в одном поколении мутагенный препарат иодацетамид (“ВитаРеактив”, Россия). От этой группы было получено потомство с муковисцидозом. Экспериментальное воздействие препарата иодацетамид на структуру гена *delF508* приводит в молекуле аминокислоты фенилаланин синтезируемого трансмембранного белка CFTR к нарушению структуры и функции синтезируемого белка, в результате чего секрет, выделяемый этими железами, становится чрезмерно густым и вязким. При этом страдают легкие,

желудочно-кишечный тракт, поджелудочная железа. Мы создали химическим путем искусственную мутацию гена delF508 препаратом иодацетамидом. При его воздействии отмечается антагонизм этого соединения в отношении электрофизиологических эффектов ГАМК на мембраны. В третьих, ГАМК-литики из группы блокаторов ионофора тормозят связывание специфических лигандов хлор-ионных каналов 3Н-третбутилбициклоортобензоата (3Н-ТВОВ) и S-третбутилбициклофосфорионата (3S-ТВПС). Кроме того, этот судорожный агент тормозит ток хлора нейрональных мембран, что свидетельствует о блокировании ионофора. Сущность воспроизведенной мутации заключается в выпадении триплета, кодирующего аминокислоту фенилаланин. Вследствие этого дефекта молекула МВТР утрачивает аминокислотный остаток в позиции 508. Полученным с мутацией гена delF508 животным вводили в возрасте 3 недели раствор наноглины кристаллов монтмориллонита («двумерные гены») с помощью зонда и глиняный раствор вместо воды. Рацион был насыщен йодом: грецкие орехи, морская рыба. Исследуем уровень иммунореактивного трипсина в сухом пятне крови. Диагностически достоверным критерием муковисцидоза является содержание ионов хлора выше 60 ммоль/л и натрия — выше 70 ммоль/л. Далее мы проводили исследования первичной структуры белков. Сначала получили соответствующую кДНК, затем идентифицировали клон, относящийся к анализируемому белку и по чередованию в нем нуклеотидов с использованием библиотеки аминокислотных последовательностей определяли первичную структуру восстановленного белка МВТР, ранее с утраченными аминокислотными остатками в позиции 508.

Результаты исследования. Восстановление дефектного гена delF508 происходило в течении 3 месяцев после начала введения раствора наноглины («двумерных генов») с указанной диетой. Процесс «восстановления» гена происходит в течении 3 месяцев и восстанавливается молекула МВТР с всеми аминокислотными остатками, особенно в позиции 508. Ранее мутированный ген delF508 восстанавливает свою структуру и конформацию, возвращается исходная модификация. Кристаллы глины обволакивают несовершенные и недостроенные структуры в клетках, проникают через клеточную мембрану на 80 %, проходят гистогемэнцефалический барьер и успешно проникают во все структуры клеток и тканей. Эти очищенные кристаллы переносят на своей поверхности нуклеотиды, аминокислоты, остатки сахаров рибозы. Поры имеющиеся на поверхности кристаллов удерживают субстраты необходимые для формирования

цитоскелета клеток, синтеза аминокислот, ферментов, восстановления первичной структуры белков, пептидной связи, нуклеотидной последовательности, транспорта белков, стабилизация пространственной структуры белков. При взаимодействии “двумерных генов” на недостроенные или нуклеотиды с дефектной структурой происходит так называемая перестройка генов. “Двумерные гены” глины стимулируют одну из особенностей генов эукариотических клеток – перестройку генов. Этот механизм обеспечивает резкое увеличение копий тех или иных белков, необходимых для реализации клеточного метаболизма. В процессе элонгации при переносе гидролизе сложноэфирных связей, перенос из Р – центра в А – центр и образование пептидной связи осуществляется при помощи фермента транспептидазы а в дефектных генах эту роль выполняют двумерные гены глины, которые проникают в 50S рибосомальную субъединицу. Таким образом, в А – центре образуется дипептид неорганической природы, соединенный с тРНК, а в пептидилном – свободная тРНК. Затем рибосома перемещается на один кодон мРНК в направлении 5' → 3', при этом комплекс тРНК – дипептид перемещается в Р – центр, а в освободившийся А – центр попадает третий кодон мРНК. Находившаяся до этого в Р – центре тРНК отделяется от рибосомы и уходит в цитоплазму. Перемещение рибосомы по цепи мРНК происходит с помощью третьего фактора элонгации TF – G и требует затраты энергии ГТФ. Таким образом, в клетке с дефектными генами завершается цикл элонгации, и белок – синтезирующаяся система готова к образованию следующей пептидной связи. Это было доказано при хроматографии и определении первичной структуры при анализе белков. По ДНК анализу и секвенированным образцам не обнаруживается мутация в локусе исследуемых хромосом. Восстанавливается содержание ионов хлора, натрия, уровень трипсина, ток хлора нейрональных мембран, что свидетельствует о разблокировании ионофора.

Обсуждение результатов. Наше внимание привлекает возможность генотерапии этого заболевания, в частности, методы генноинженерного лечения МВ. Успешное создание модели МВ на лабораторных крысах позволило получить положительные результаты о полном восстановлении мутированного дефектного гена delF508 с использованием «двумерных генов» кембрийских глин. Создание препарата с наночастицами “двумерных генов” кембрийских глин позволит в будущем широко использовать его как класс лекарств, нормализующих работу генов, как средство для целевого воздействия на геном, как генный регулятор

человеческого организма, как универсальная антимуtagenная прививка и корректирующая ДНК вакцина. Использование для нормализации генов в больших массивах клеток, как средство при извлечении из клонков ненужных веществ, при восстановлении дефектных и мутированных генов при онкологических заболеваниях. В данной экспериментальной работе нормализация функций “дефектного” гена delF508 непосредственно в геноме больного муковисцидозом животного реализуется возобновлением его функций путем исправления его, разблокированием, дополнением недостающей структурной частью.

Литература

1. Агбангла К., Осинская Н. С., Иващенко Т. Э., Баранов В. С. Молекулярногенетический анализ тандемных повторов в интроне 6В гена СРTR в некоторых популяциях и у больных муковисцидозом. // Генетика. 1992. том 28. №11. 145-150.
2. Бакай М. А., Швед Н. Ю., Гембицкая Т. Е., Желенина Л. А., Орлов А. В., Иващенко Т. Э, Генетические факторы, влияющие на фенотипическое проявление муковисцидоза. // Медико-генетическая служба СПб. К 30летию МГЦ. 1999. СПб. 79-83.
3. Потапова О. Ю. Молекулярно-генетический анализ кистозного фиброза в России. //Автореф. дис. канд. биол. наук. СПб. 1994.
4. Abeliovich O., Lavol I., Lerer I. et al. Screening for Five Mutations Detects 97% of Cystic Fibrosis (CP) Chromosomes and Predicts a Carrier Frequency of 1:29 in the Jewish Ashl
5. Boucher R.C. Status of gene therapy for cystic fibrosis lung disease. // J Clin1.vest. 1999. V.I03. P.441-446.
6. Dean M., White M., Amos J . et al. Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. // Cell. 1990. V. 61. P. 863-870.
7. Duncan A., Buchwald M., Tsui L.-C. Sublocalization of two cloned chromosome7 sequence closed linked to the cystic fibrosis Cytogenet. // Cell Genet. 1988. V. 49. P. 309-310.

8. Eiberg H., Morh J . , Schmiegelow K., Nielsen L.S., Williamson R. Linkagerelationship of paraoxonase (PON) with other markers: Indication of P O N cystic fibrosis syntheny. // Clin.Genet. 1985. V. 28. P. 265-271.
9. Griesenbach U., Chonn A., Cassady R., et al. Comparison betweenintratracheal and intravenous administration of liposome-DNA complexes for cystic fibrosis lung gene therapy. // Gene Therapy. 1998. V.5. P.181-188.
10. Kerem B. S., Rommens J .M. ,Buchanan J.A. et al. Identification of the cysticfibrosis gene: genetic analysis. // Sc ience. 1989. V.245. P.1073-1080.
11. Mulivor RA, Hannig VL, Harris H. Developmental change in human intestinalalkaline phosphatase. // Proc Natl Acad Sei U S A 1978 V. 75. N 8. P. 3909-12
12. Rozmahel R., Wilschanski M., Matin A. et al. Modulation of diseaseseverity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. // Nat.Genet. 1996. V. 12. P.280-287.
13. Seidegard J . , Pero W. R. The hereditary transmission of high glutathionetransferase activity towards trans-stilbene oxide in human mononuclear leucocytes. // Hum.Genet. V.69. 1985. P. 66-68.
14. Verlingue C , Kapranov N. I., Mercier B. et al. Complete Screening ofMutations in the Coding Sequence of the CFTR Gene in a Sample of CF Patients From Russia: Identification of Three Novel Alleles. // Human mutation. V. 5. N 3. P. 205-210.

Abstract

Experimental data on restoration of a defective gene of delF508 mukoviszidozis are presented (MB) (cystous fibrosis of a pancreas) - the most widespread, serious monogenic illness, inherited on autosomno-recessive type. Disease frequency in different populations, the nations and ethnic groups significantly varies, averaging 1: 2-2,5 thousand newborns at representatives of white race. By World Health Organization estimates in the world 45-50 thousand children with MB annually are born, and the number of heterozygotic carriers of a disease totals many tens of millions. At representatives of black race the frequency of MB on the average lower and makes 1: 9 - 10 thousand newborns, and at yellow race this disease meet even less often

(Goodchild, Dodge, 1987). Our attention is drawn by possibility of a gene therapy of this disease, in particular, methods of genetic engineering treatment of MB. Successful creation of the MB model on laboratory rats allowed to receive positive results about a complete recovery of the mutated defective gene of delF508 with use of "two-dimensional genes" cambrian clays.

Keywords: mukoviszidozis, delF508 gene, gene therapy, two-dimensional gene of clay.

Buriachenko S. V.

V. N. Karazin Kharkiv National University, faculty of biology, biochemistry school, 61107 Svoboda Sq. 4. Kharkiv, Ukraine.
Email: semenb837@gmail.com

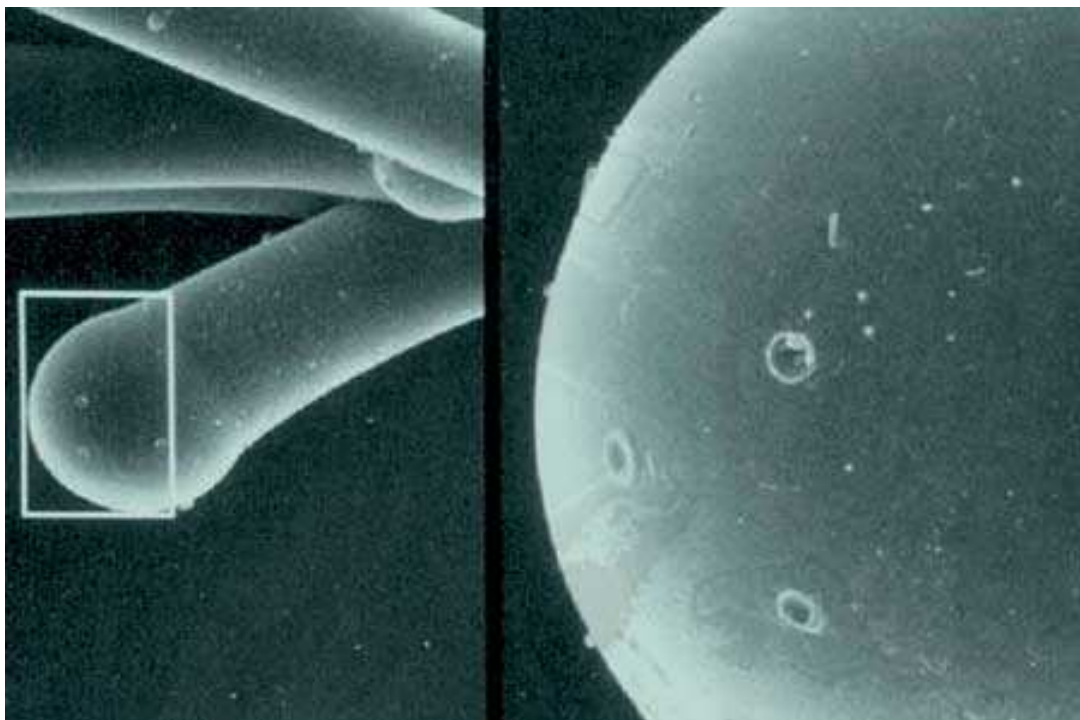


Рис.1. Наночастицы “двумерного гена” кристаллов глин использующие при восстановлении “дефектного гена delF508 и белка МВТР.

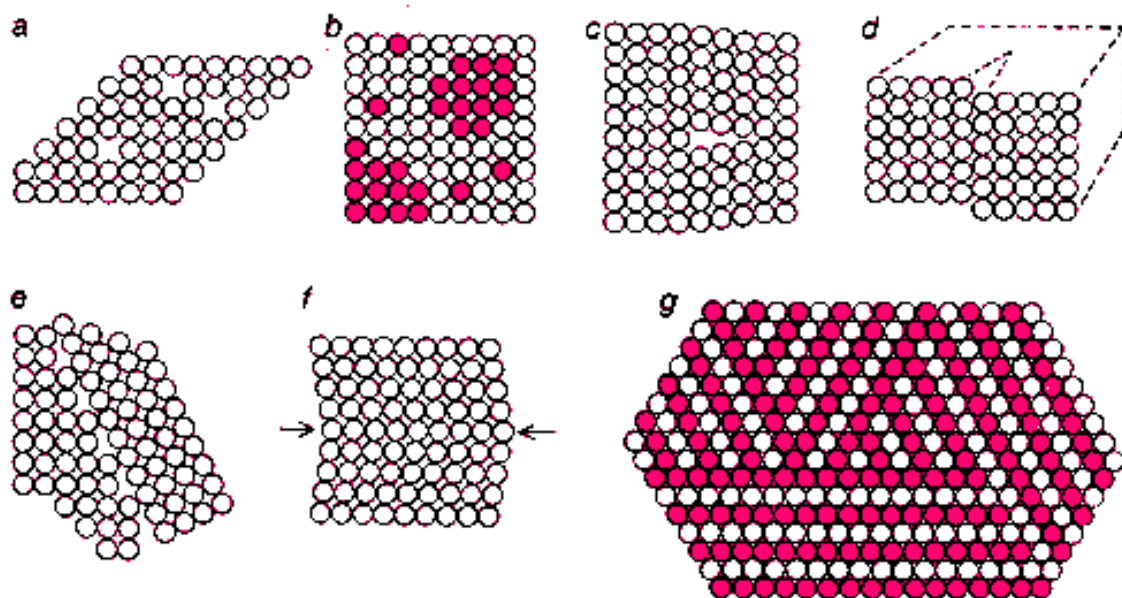


Рис. 2. Кристаллические гены обладают правильной комбинацией структурных и ростовых признаков и признаков делимости. Информация хранится в одномерных или двумерных кристаллических генах. В случае одномерного гена (вверху) она содержится в детальной структуре ряда взаимодействующих слоев (выделено цветом), которая сохраняется при репликации генов (а, b). Рост происходит только по окрашенным граням, а разделение идет только в параллельном им направлении. Физические свойства слоев, несущих информацию, имеют различные (например, это могут быть по-разному уложенные кристаллические структуры); то же касается их химического состава. В двумерных кристаллических генах (внизу) информация может храниться в форме специфической пространственной организации (в отношении и физических, и химических свойств) на грани кристалла (показано цветом). Эта организация сохраняется при репликации гена (с, d) за счет роста на окрашенной грани и при его расщеплении по плоскости, параллельной этой грани.

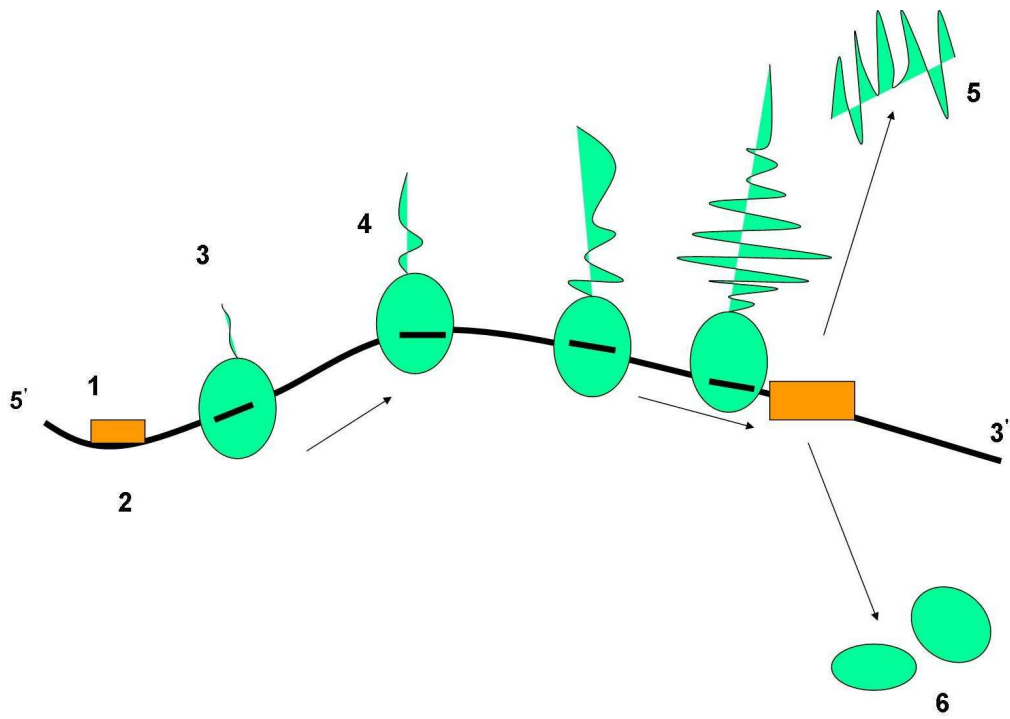


Рис. 3. Освобождение белка из рибосомы: 1 – старт, 2 – мРНК, 3 – Рибосомы, 4 – растущие полипептиды, 5 – освободившийся полипептид, 6 – освободившиеся субъединицы рибосомы.

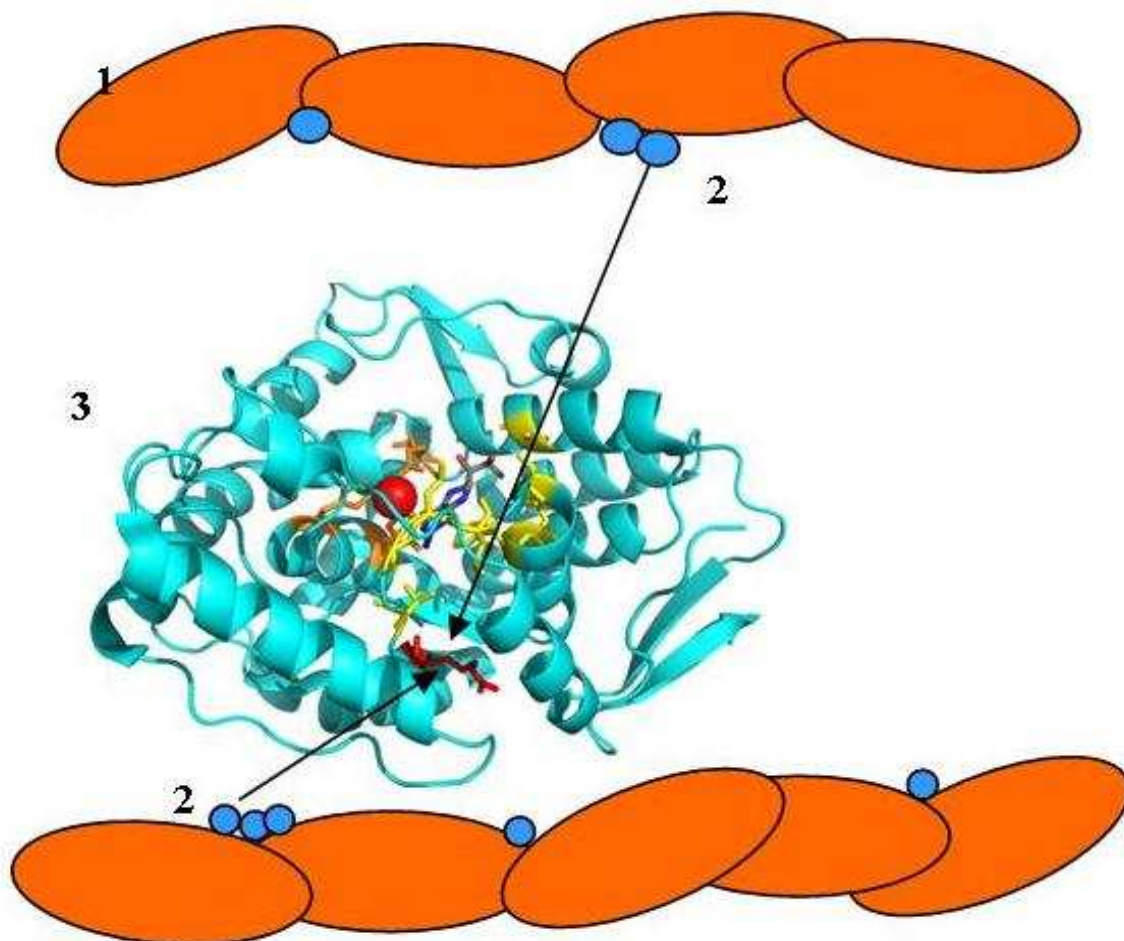


Рис. 4. Нормализация функций “дефектного” гена delF508 непосредственно в геноме больного муковисцидозом животного реализуется возобновлением его функций путем исправления его, разблокированием, дополнением недостающей структурной частью: 1 – кристаллы “двумерных генов” глины, 2 – субстрат в порах кристалла, 3 – “дефектный ген” delF508.