

# Эволюция в пробирке

А. В. ВЛАСОВ



ВЛАСОВ Александр  
Валентинович — кандидат  
химических наук, научный  
сотрудник Института  
химической биологии  
и фундаментальной  
медицины СО РАН  
(Новосибирск)

*Давняя мечта химиков и биологов — научиться создавать молекулы с определенными заданными свойствами, которые могли бы стать основой молекулярных устройств или новых материалов с нужной биологической активностью.*

*До недавних пор основным подходом к решению этой проблемы был так называемый молекулярный дизайн. Химики на основании теоретических рассуждений и экспериментальных фактов пытались представить, как должна быть устроена молекула, чтобы она обладала требуемыми свойствами. Затем такие молекулы синтезировали и проверяли соответствие полученного с ожидаемым.*

*К сожалению, предсказательная сила современных теоретических методов невысока, а сам синтез новых соединений — дело долгое и трудоемкое. Поэтому создание новых соединений методом рационального дизайна требует синтеза и исследования большого количества разных соединений, являясь дорогим малопродуктивным способом. Кроме того, этот подход может быть применен лишь тогда, когда ученый понимает, как должна быть устроена искомая молекула, чтобы обладать требуемыми свойствами. А бывает это, к сожалению, не всегда. Как же быть в таких случаях?*

## От дизайна — к селекции

Озадаченные необходимостью получения молекул с заданными свойствами, молекулярные биологи в течение последних 15 лет пытались решать эту задачу с помощью другого подхода — подхода, издавна использующегося самой Природой. Конкретнее — путем создания условий, когда начинает работать механизм молекулярной селекции, как это происходило на определенных стадиях эволюции живых систем.

Были разработаны методы получения сложных смесей разных молекул и процедуры, в результате которых из таких смесей автоматически отбирались и размножались

молекулы с заданными свойствами. В результате использования этого крайне эффективного подхода неизмеримо расширились возможности ученых в области создания необычных катализаторов и молекул-рецепторов, связывающих разные химические соединения.

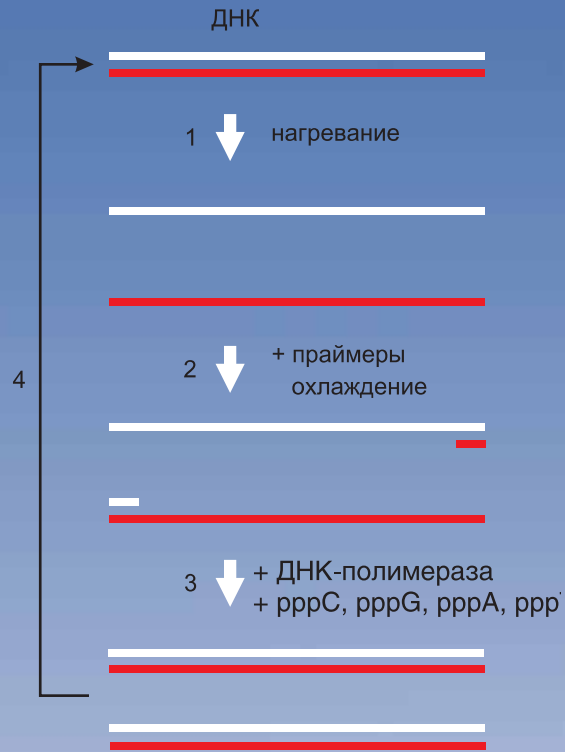
Сейчас комбинаторные методы широко используются химиками-органиками: синтезируются «библиотеки» органических соединений различной структуры, и затем с помощью физико-химических методов из них «вылавливается» то, что нужно. Но задача эта не так проста, как кажется, поскольку из огромного количества полученных молекул нужно идентифицировать и выделить лишь малую часть. Иногда — исчезающе малое количество материала... Если речь идет о нескольких молекулах из миллиардов, то никакими обычными химическими методами выделить и охарактеризовать их невозможно — если только не иметь возможности размножить их после выделения. Поэтому химики так завидуют молекулярным биологам, которые умеют неограниченно размножать молекулы из своих библиотек, построенных из нуклеиновых кислот, с помощью замечательного процесса — *полимеразной цепной реакции* (ПЦР).

### Суть метода

Открытый в 1985 г. метод ПЦР, позволяющий в неограниченных количествах размножать нуклеиновые кислоты — ДНК и РНК — стал основой современной молекулярной селекции. Используя его, на конечном этапе синтеза можно получить просто астрономическое число копий каждой молекулы, присутствующей в растворе изначально.

Но первой стадией молекулярной селекции является получение пула разнообразных молекул, т. е. создание *молекулярной библиотеки нуклеиновых кислот*. Так ученые называют смесь молекул нуклеиновых кислот, имеющих одинаковую длину, но отличающихся последовательностью нуклеотидов. Получить их можно, если при синтезе нуклеиновой кислоты на специальном автоматическом синтезаторе добавлять на каждой стадии сразу все четыре мономера (А, Т, G, С). Следует отметить, что к каждой молекуле добавляются *фланкирующие* (концевые) участки определенной последовательности, позволяющие в дальнейшем проводить ПЦР.

В молекулярной селекции обычно используются молекулы с «длиной» в 30–80 нуклеотидов. То есть получаемая в результате синтеза полная библиотека будет содержать весь набор возможных последовательностей; от  $4^{30}$  до  $4^{80}$  — около  $10^{48}$  разных молекул!



В основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) лежит способность фермента ДНК-полимеразы с фантастической скоростью синтезировать из мономеров-нуклеотидов комплементарные цепочки ДНК. С помощью этого фермента из одной двуцепочечной молекулы ДНК получается две ее точные копии, далее — четыре, а после  $n$  циклов построений —  $2^n$  копий каждой молекулы, присутствовавшей на начальном этапе. При множественном повторении цикла «нагревание/охлаждение» имеющийся препарат ДНК можно размножить в неограниченных количествах. Обычно исследователи проводят около 30 циклов и получают астрономическую цифру  $2^{30}$  копий

На заре открытия ПЦР процесс этот для исследователя был не из легких — приходилось постоянно бегать с пробирками в руках между тремя термостатами. К счастью, в наши дни существуют специальные ПЦР-машины, способные быстро менять температуру по заданной программе в циклическом режиме и одновременно работать с десятками образцов. Теперь исследователю достаточно только поставить пробирки и нажать кнопку. *Фото автора*

кул! А поскольку в зависимости от последовательности нуклеотидов нуклеиновые кислоты могут сворачиваться самыми разными способами, то получаются смеси, содержащие огромное структурное разнообразие молекул. На селекционный отбор даже невозможно взять всю библиотеку; обычно используют лишь «малую» часть — «всего»  $10^{15}$  молекул, с которыми реально можно работать.

Синтезируют обычно молекулы ДНК (поскольку это дешевле и эффективнее, чем синтез РНК), на которых сразу можно проводить селекционный отбор. Но поскольку РНК обладает более широким репертуаром возможностей, чем ДНК, то с синтезированной ДНК при желании с помощью фермента *РНК-полимераза* можно считать РНК-копию и провести отбор по сходной схеме.

### Что захочешь — то и получишь!

Сам процесс отбора искомым молекулам начинается с того, что полученную молекулярную библиотеку наносят на колонку, где находится какое-то вещество, с которым и должны связываться эти молекулы. В ре-

зультате проведенной селекции выбираются определенные молекулы — конечно, из тех, что присутствовали в исходной смеси, сложность которой ограничена по очевидным физическим причинам. Однако относительно простая модификация схемы эксперимента позволяет использовать мощный естественный фактор, благодаря которому процедура отбора молекул превращается в процесс, аналогичный эволюции природных живых систем.

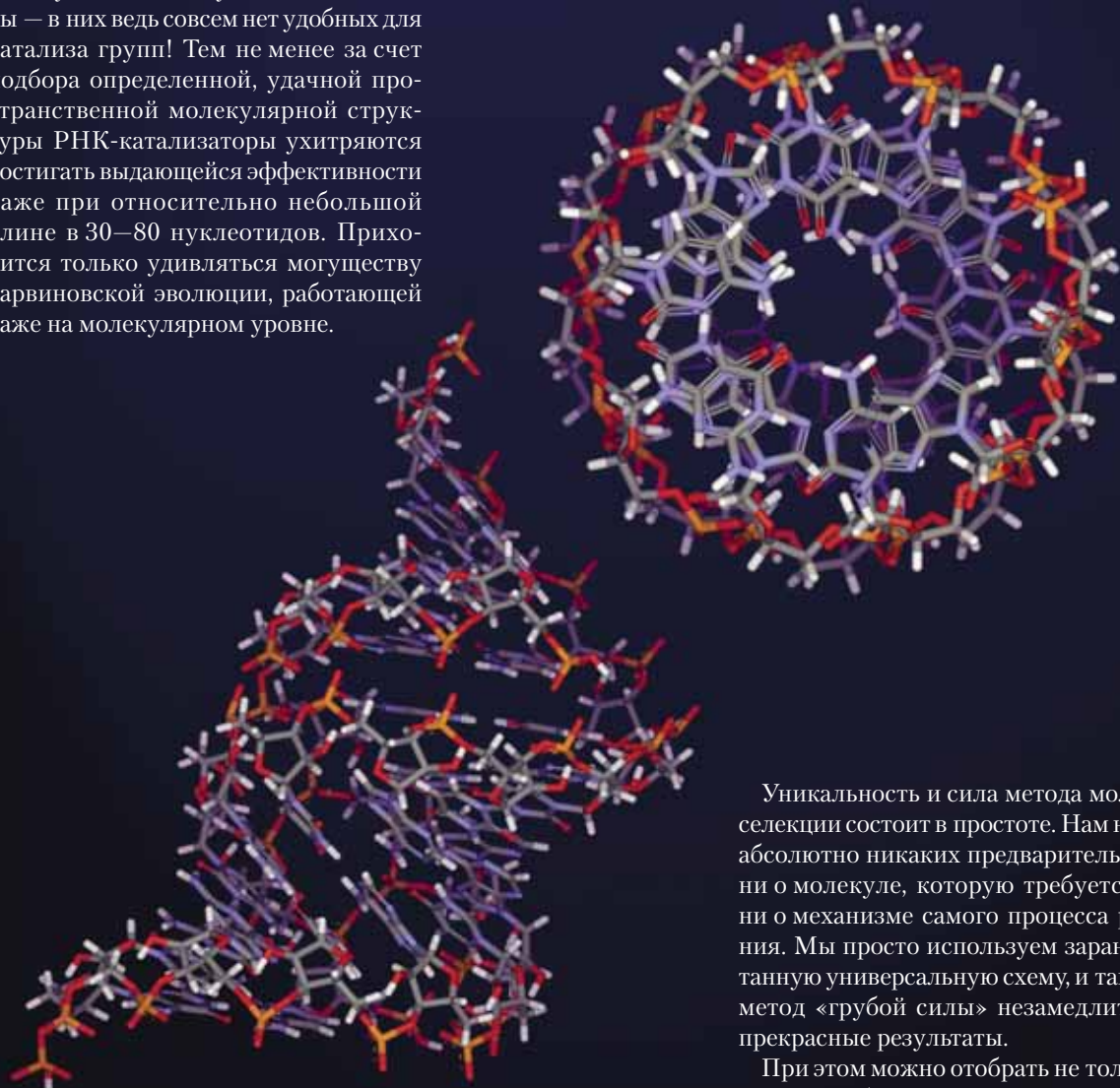
Дело в том, что в процессе размножения молекул ДНК копирующие ферменты можно заставить немного «ошибаться». При этом в отобранные молекулы вносятся мутации, и конечный набор молекул становится несколько отличным от исходного — полная аналогия природному процессу. За счет некоторых мутаций могут получаться молекулы с более подходящими свойствами, которые, естественно, и будут накапливаться в смеси при повторении этапов отбора. Настоящая мини-эволюция в пробирке!

По окончании отбора нужно установить нуклеотидные последовательности молекул-чемпионов, для чего их индивидуально тестируют и изучают. Весь процесс от начала до конца занимает несколько недель, в случае его автоматизации — дни. В результате селекции можно получить так называемые *РНК-аптамеры*, связываю-



щие определенные молекулы (от латинского слова *aptus* — подходить), или *рибозимы* (слово образовано слиянием слов «рибонуклеиновая кислота» и «энзим», белковый фермент), катализирующие определенные реакции.

Между прочим, первая реакция при взгляде на формулы нуклеотидов — недоверие. Недоумеваешь, как из таких молекул можно получить катализаторы — в них ведь совсем нет удобных для катализа групп! Тем не менее за счет подбора определенной, удачной пространственной молекулярной структуры РНК-катализаторы ухитряются достигать выдающейся эффективности даже при относительно небольшой длине в 30–80 нуклеотидов. Приходится только удивляться могуществу дарвиновской эволюции, работающей даже на молекулярном уровне.



Пространственная структура двуцепочечной молекулы РНК

Уникальность и сила метода молекулярной селекции состоит в простоте. Нам не требуется абсолютно никаких предварительных знаний ни о молекуле, которую требуется отобрать, ни о механизме самого процесса распознавания. Мы просто используем заранее разработанную универсальную схему, и такой простой метод «грубой силы» незамедлительно дает прекрасные результаты.

При этом можно отобрать не только аптамеры или рибозимы, но и молекулы с любыми другими свойствами, главное — придумать саму процедуру отбора этих молекул. Метод молекулярной селекции очень эффективен благодаря высокой скорости, достигаемой за счет параллельности процессов и огромного количества одновременно тестируемых молекул.

## «Практичные» рибозимы и аптамеры

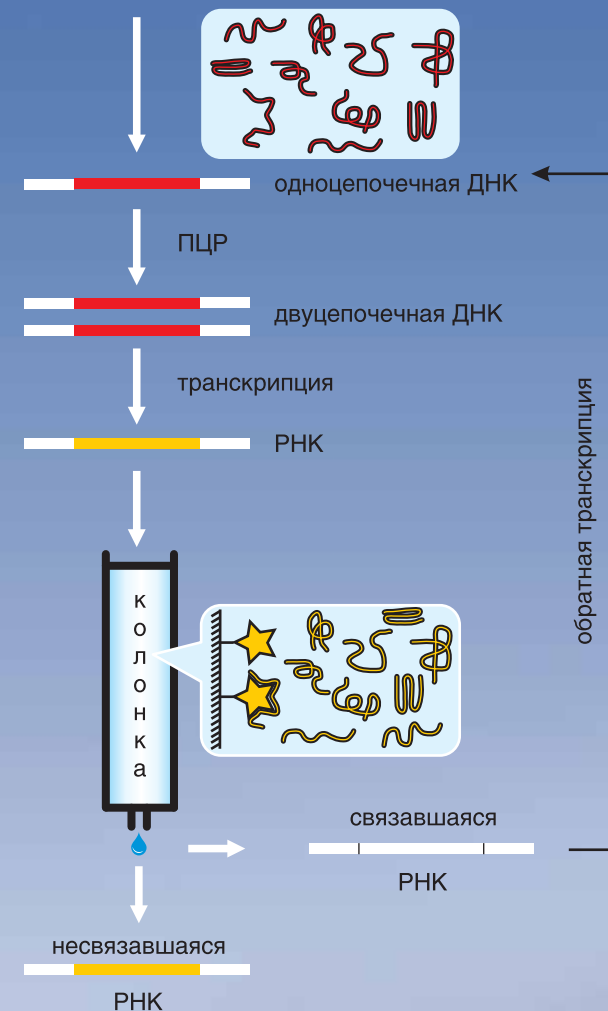
За пятнадцать лет с момента изобретения метода молекулярной селекции в лабораториях было отобрано множество рибозимов, катализирующих различные реакции и имеющих реальное практическое применение. Среди них есть рибозимы, осуществляющие реакцию аминокислотирования РНК, формирование амидной, пептидной и гликозидной связей, алкилирование РНК, фосфорелирование, полимеризацию и многое другое.

Пожалуй, наибольший интерес из всех вызвали рибозимы, способные расщеплять молекулы РНК. Подобные рибозимы широко распространены в природе, но благодаря молекулярной селекции удалось отобрать гораздо более эффективные РНК- и ДНК-катализаторы.

Молекулы эти состоят из определенных (*фланкирующих*) нуклеотидных последовательностей, специфично связывающихся с РНК-мишенью, и каталитической части, вызывающей расщепление мишени. Каждый рибозим способен таким образом «уничтожить» множество молекул-мишеней. Очевидное применение этих молекул — использование их в терапевтических целях: для расщепления вирусных РНК либо «излишних» РНК, т. е. тех РНК, которые организм производит в избыточном количестве в случае некоторых заболеваний. Ряд подобных препаратов находится на данный момент на стадии клинических испытаний, в том числе — использующийся для терапии рака «Херзим» (*Herzyme*), направленный против человеческого фактора роста эпидермиса (*Her2*).

С помощью метода молекулярной селекции были отобраны и тысячи аптамеров, образующие специфические комплексы с самыми различными органическими соединениями и биологическими молекулами, включая факторы роста, ферменты, антитела, рецепторы, вирусные белки. Можно даже получить аптамеры на весь организм — например, на определенную бактерию, которые будут связываться с ее различными поверхностными структурами. И многие из таких аптамеров были получены как раз для решения практических задач.

По механизму действия аптамеры очень напоминают антитела — белки, которые нарабатывает наша иммунная система для распознавания и борьбы с чужеродными веществами, попавшими в кровоток. Однако аптамеры обладают рядом уникальных свойств, что дает им некоторые преимущества перед антителами. Так, моноклональные антитела получают в живом организме или в тканевой культуре. Аптамеры же получают селекцией в пробирке, а далее выявленные последовательности синтезируют искусственно, что гораздо быстрее, дешевле и проще. К тому же благодаря



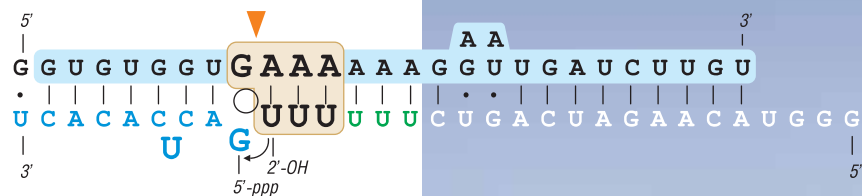
Первый этап процесса молекулярной селекции — нанесение молекул РНК из молекулярной библиотеки на колонку. Лишь несколько молекул РНК с подходящей структурой свяжутся с колонкой, в то время как подавляющее большинство молекул не взаимодействует с ней. После отмыва колонки связанную фракцию далее «снимают», переводят в форму ДНК с помощью фермента *обратная транскриптаза* и размножают методом ПЦР. Получается новая библиотека (пул) молекул, которые будут связываться с колонкой гораздо лучше. Поскольку мир не идеален, одного цикла селекции не бывает достаточно из-за неполного удаления различных неспецифических РНК. Обычно требуется около 10 циклов, чтобы отобрать несколько уникальных последовательностей из  $10^{15}$  кандидатов

химическому синтезу всегда гарантирована четкая безошибочная последовательность и качество.

Можно создать аптамеры, связывающиеся с любыми веществами, тогда как антитела можно наработать только на довольно узкий круг веществ, нетоксичных для организма. Аптамеры же получают контролируемым способом — поэтому в процессе можно использовать любую концентрацию соли, любую кислотность, температуру и т. д. К тому же аптамеры нетоксичны, не вызывают аллергии, их можно модифицировать введением дополнительных химических группировок, при этом они стабильны при хранении.

### Необычные лекарства

Одним из наиболее известных является недавно полученный аптамер к фактору свертывания крови IXa. Суть заключается в следующем: в клинической практике желательно, чтобы в ходе хирургической операции кровь не сворачивалась, для чего исполь-



зуют *антикоагулянты* — специальные вещества, препятствующие свертыванию крови. Однако сразу после операции самым важным становится быстрее заживление ран. Однако антикоагулянты, способствуя успешной операции, создают затем большой послеоперационный риск из-за обильных кровотечений, которые могут привести даже к смертельному исходу. Поэтому действие такого лекарства обязательно должно сниматься специальным антидотом.

В настоящее время в качестве антикоагулянта широко используется гепарин — поскольку он является единственным подобным веществом, для которого есть антидот, полипептид протамина. К сожалению, в использовании гепарина существует ряд ограничений, и кроме того, он токсичен.

Для расширения круга антикоагулянтных препаратов был проведен селекционный отбор. Модифицированная молекула РНК, полученная в ходе этой селекции, эффективно снижает свертываемость крови и в отличие от гепарина нетоксична и не вызывает аллергии. Далее к этому

аптамеру был синтезирован *антидот* — так называемый *антисмысловый* олигонуклеотид, который мог контролировать активность антикоагулянта и за короткое время обращать действие РНК-аптамера. К настоящему моменту получено уже несколько аптамеров, которые являются кандидатами для создания нового поколения антикоагулянтов.

Аптамеры потенциально могут найти широкое применение в клинике в качестве лекарственных препаратов. Наиболее, пожалуй, хорошо изучен аптамер, направленный против *везикулярного фактора роста эндотелия* (VEGF), который служит мишенью в терапии заболеваний сосудов. И хотя только рибозимы способны расщеплять РНК-мишень, а аптамеры лишь сверхпрочно связываются с ней, в конечном счете эффект получается тот же: синтез «вредного» белка прекращается.

Вышеупомянутый препарат модифицированной РНК (Macugen или Pegaptanib) уже прошел клинические испытания. Он используется для лечения *макулярной дегенерации* — болезни, служащей главной причиной необратимой потери зрения среди людей в возрастной

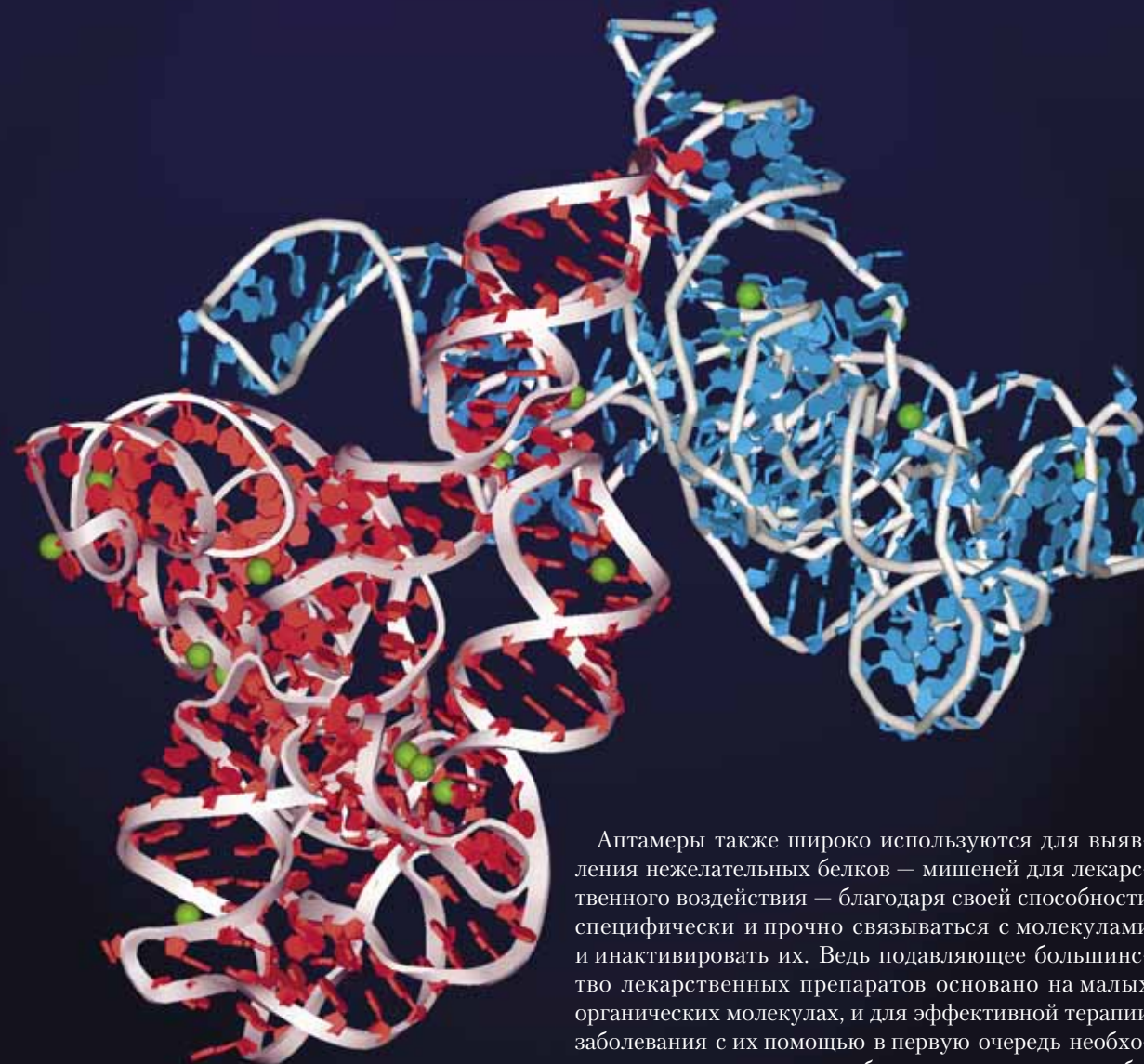
группе старше 55 лет. Лекарство-аптамер вводят непосредственно в глаз пациенту, причем для улучшения состояния достаточно нескольких сеансов.

Помимо РНК- широко используются также ДНК-аптамеры. В обоих случаях для придания лечебным молекулам повышенной устойчивости к действию расщепляющих ферментов, улучшения способностей к связыванию с мишенью либо для обеспечения специфической доставки в организме в них зачастую вводятся дополнительные химические группы.

### Прямое попадание

Помимо прямого воздействия на РНК-мишень, аптамеры, подобно антителам, могут доставлять небольшие органические молекулы (лекарства, токсины) прямо в определенные виды клеток. Например, при терапии раковых заболеваний аптамеры «узнают» специфические рецепторы на поверхности раковых клеток и связываются с ними, высвобождая свой смертоносный груз и таким образом специфически уничтожая эти клетки.

Слева — формула отобранного с помощью молекулярной селекции рибозима, умеющего эффективно сшивать фрагменты РНК. На ранних стадиях эволюции — в гипотетическом «мире РНК» (см. «Наука из первых рук», 2004, №2) — подобные примитивные рибозимы могли из маленьких кусочков постепенно наращивать длинные молекулы, которые уже могли выполнять различные сложные функции



Аптамеры также широко используются для выявления нежелательных белков — мишеней для лекарственного воздействия — благодаря своей способности специфически и прочно связываться с молекулами и инактивировать их. Ведь подавляющее большинство лекарственных препаратов основано на малых органических молекулах, и для эффективной терапии заболевания с их помощью в первую очередь необходимо знать, уровень какого белка надо понизить, чтобы победить болезнь.

Очевидным применением аптамеров в медицине является и детекция различных молекул. Например, в некоторых случаях аптамер, специфичный к определенной молекуле, иммобилизуют (закрепляют) на поверхности пластинки. Далее на нее наносится образец. Если в образце присутствуют искомые молекулы, то они быстро связываются с аптамером.

Продукт естественной эволюции — природный рибозим, выделенный из инфузории *Tetrahymena thermophila*

Потом добавляют второй аптамер, который может нести, например, какую-нибудь флуоресцентную группу и который способен узнавать комплекс из первого аптамера с молекулой-мишенью. Если после отмывки пластинка светится — значит, образец содержал искомую молекулу, если же нет — она отсутствует, и весь второй аптамер был смыт с пластинки.

В результате подобных процедур было показано, что с помощью аптамеров можно определять очень низкие количества иммуноглобулинов E-класса в препаратах

крови, что недостижимо с помощью обычных моноклональных антител. Аптамеры могут высокоспецифично выявлять опухолевые маркеры, что дает возможность использовать их для диагностики некоторых видов рака. Также они могут найти применение в экстренных медицинских ситуациях и в ходе военных действий, когда важно быстро определить в образцах содержание отравляющих веществ.

### Новый этап — селекция белков

Несколько усложнив экспериментальные системы, молекулярным биологам удалось применить принципы и подходы молекулярной эволюции для получения уже белковых молекул с заданными свойствами

твами. Ведь белок синтезируется в соответствии с генетическими программами, которые представляют собой нуклеотидные последовательности ДНК.

Если взять в качестве программы обычную молекулярную библиотеку последовательностей ДНК, как это делалось в селекционных экспериментах по получению аптамеров, и затем осуществить на ней синтез белка, то получится соответствующий по сложности набор белковых молекул. И если придумать способ отбора последних по функциональным свойствам и способ размножения кодирующих их ДНК-программ, то задача будет решена.

На сегодня реализовано два варианта решения проблемы. При подходе, названном «рибосомный дисплей», транслируемый белок остается связанным с рибосомой

(клеточным элементом, который осуществляет сборку белковой молекулы) и кодирующей его матричной РНК. Этот комплекс из трех компонентов и используют для селекционного отбора.

В случае так называемого «мРНК дисплея» кодирующую белок матричную РНК транслируют и затем «пришивают» к синтезированному белку. Полученные гибридные молекулы очищают от компонентов

«метод грубой силы», основанный на комбинаторных подходах и молекулярной селекции, все шире используется в исследовательской практике и прикладных работах. Автоматизация процессов, использующихся в селекционных экспериментах, и создание эффективной робототехники делают его все более эффективным, позволяют решать все более сложные задачи по созданию молекул с заданными свойствами.

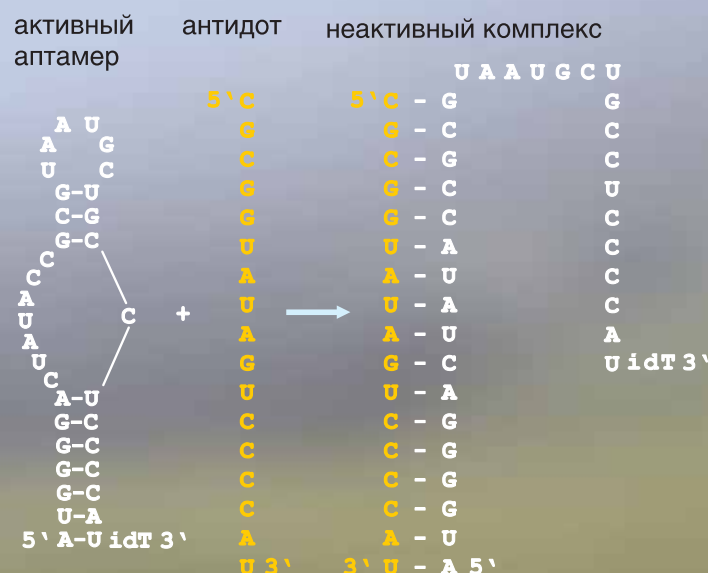
Очевидно, следующим шагом в области молекулярной селекции будет конструирование более сложных систем, которые позволят создавать уже не просто «умные молекулы», но, например, простейшие искусственные клетки для биотехнологических целей. Ведь эволюция, как ей и положено — процесс безостановочный...

При селекции из белковых библиотек в случае «мРНК дисплея» белок «пришит» к соответствующей мРНК, благодаря чему можно размножить отобранные в ходе селекции молекулы

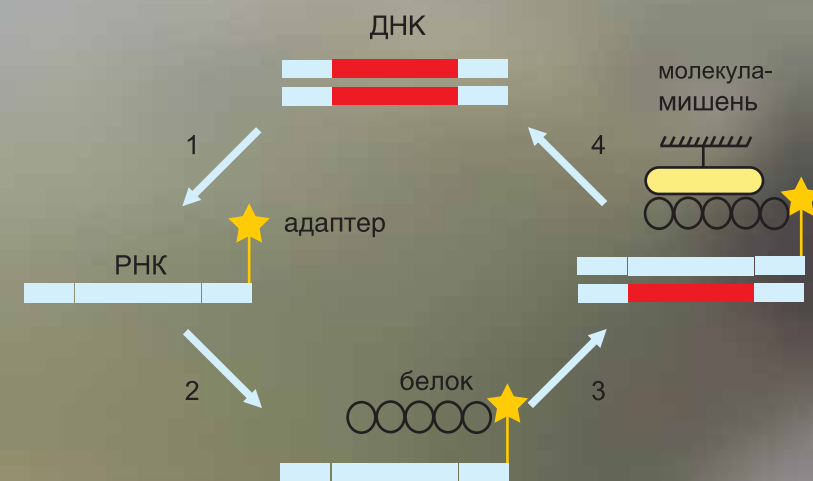
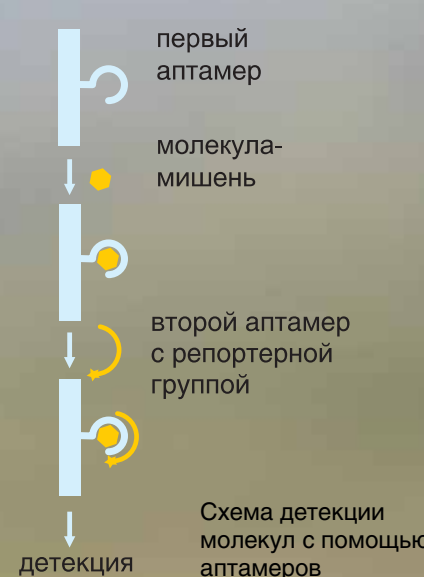
### По пути молекулярной эволюции

За считанные годы с момента ее изобретения молекулярная селекция нашла множественные применения в различных областях молекулярной биологии, биохимии и медицины. Спектр оказался очень широк: от фундаментальной науки (гипотеза «мира РНК») до практических применений в биотехнологиях и медицине, включая средства диагностики и лекарства. Этот

рибосомы и используют для селекции. В результате экспериментов с использованием этих схем были получены высокоспецифичные и прочно связывающиеся пептиды, антитела и ферменты.



Аптамер к фактору свертывания крови IXa. Антисмысловый олигонуклеотид в роли антидота способен связываться и инактивировать антикоагулянт



Редакция благодарит к. х. н. В.В. Ковалю (ИХБФМ СО РАН) за помощь в подготовке иллюстративного материала