

результатом реализации генетической информации не с одной последовательности нуклеиновой кислоты, а с большого множества.

Список литературы

1. Cobb M. 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology // PLoS biology. – 2017. – Vol. 15. – №9. – P. e2003243.
2. Crick F.H.C. On protein synthesis // Symposia of the Society for Experimental Biology. Symposia on the society for Experimental biology number XII: The Biological Replication of Macromolecules. – 1958. – Vol. 12. – P. 138 – 163.
3. Ito T. Nucleosome assembly and remodeling // Protein Complexes that Modify Chromatin. – 2003. – Vol. 274. – P. 1 – 22.
4. Kumar S., Chinnusamy V., Mohapatra T. Epigenetics of modified DNA bases: 5 – methylcytosine and beyond // Frontiers in genetics. – 2018. – Vol. 9. – P. 640.
5. Wang, Z., Yao, H., Lin, S., Zhu, X., Shen, Z., Lu, G., ... & Kung, H.F. Transcriptional and epigenetic regulation of human microRNAs // Cancer letters. – 2013. – Vol. 331. – №1. – P. 1 – 10.
6. Bartel D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions // cell. – 2009. – Vol. 136. – №2. – P. 215 – 233.
7. Black D.L. Mechanisms of alternative pre – messenger RNA splicing // Annual review of biochemistry. – 2003. – Vol. 72. – №1. – P. 291 – 336.
8. Pan Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., & Blencowe, B.J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high – throughput sequencing // Nature genetics. – 2008. – Vol. 40. – №12. – P. 1413 – 1415.
9. Forchhammer K., Leinfelder W., Böck A. Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein // Nature. – 1989. – Vol. 342. – №6248. – P. 453 – 456.
10. Herbst, K.L., Nichols, L.M., Gesteland, R.F., & Weiss, R.B. A mutation in ribosomal protein L9 affects ribosomal hopping during translation of gene 60 from bacteriophage T4 // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1994. – Vol. 91. – №26. – P. 12525 – 12529.
11. Kolb, V.A., Makeyev, E.V., Kommer, A., & Spirin, A.S. Cotranslational folding of proteins // Biochemistry and cell biology. – 1995. – Vol. 73. – №11 – 12. – P. 1217 – 1220.
12. Wold F. In vivo chemical modification of proteins (post – translational modification) // Annual review of biochemistry. – 1981. – T. 50. – №. 1. – C. 783 – 814.
13. Anraku Y., Mizutani R., Satow Y. Protein splicing: its discovery and structural insight into novel chemical mechanisms // IUBMB life. – 2005. – Vol. 57. – №8. – P. 563 – 574.
14. Aguzzi A. Unraveling prion strains with cell biology and organic chemistry // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Vol. 105. – №1. – P. 11 – 12.
15. Ridley R. M. What would Thomas Henry huxley have made of prion diseases? // Molecular Pathology of the Prions. – Humana Press, 2001. – P. 1 – 16.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ: ПРОШЛОЕ, НАСТОЯЩЕЕ И БУДУЩЕЕ ТЕХНОЛОГИИ

Чеботарева О.Е.

ФГБОУ ВО «ПущГЕНИ» Минобрнауки России, г. Пущино Московской области, Россия

Рекомбинантный белок - это белок, претерпевший определённые модификации и кодирующийся рекомбинантной (модифицированной) ДНК. Рекомбинантная ДНК как правило представляет собой плазмиду, в которой ген (или гены - их может быть несколько) целевого белка, располагается после промоторной области. Когда плазида вводится в систему экспрессии хозяина, его белок-синтезирующий аппарат обеспечивает продукцию

выбранного белка. Это позволяет получить большие количества данного белка для самых различных целей: исследовательских, диагностических или даже терапевтических [1].

Модифицированные белки используются не только в биомедицинских исследованиях, но и в лечении в качестве лекарств. Рекомбинантные белки, используемые в терапии заболеваний, включают гормоны, интерфероны, интерлейкины, факторы роста, факторы некроза опухолей, факторы свертывания крови, тромболитические препараты и ферменты для лечения распространенных заболеваний (к примеру, диабета, рассеянного склероза, астмы, анемии и др.) [1].

Именно благодаря технологии создания рекомбинантных белков был сделан важный прорыв в медицинской биотехнологии. Первым рекомбинантным белком, использованным в лечении, стал человеческий инсулин в 1982 году [2]. С тех пор индустрия рекомбинантных белков постепенно набирала обороты.

Данная технология биоинженерии имеет достаточно короткую, но насыщенную историю. С момента создания производства рекомбинантных белков в фармацевтической промышленности в 1980-х годах системы и методы, связанные с данной технологией, развивались вместе с разработками в других областях, обеспечивая быстрое производство множества различных целевых белков и их вариантов, специально разработанных для использования в тех или иных целях.

На протяжении 1980-х годов уровень развития ключевых технологий, позволяющих производить рекомбинантные белки, стремительно прогрессировал. Однако в фармацевтической промышленности целевые белки все ещё в значительной степени экстрагировались и очищались из тканей животных. Следовательно, многие проекты основывались на данных, которые были получены с использованием белков, не относящихся к человеку, а производительность многих анализов была ограничена количеством белка, который можно было очистить. Для практического использования обычно требовалось много партий протеина, и часто возникала проблема с изменчивостью от партии к партии [1].

Ситуация изменилась в начале 80-х с появлением и коммерциализацией автоматических секвенаторов Эдмана [3]. Эта новая технология дала возможность расшифровки аминокислотных последовательностей белков, ранее выделенных классической биохимической очисткой из тканей животных. Затем информацию о последовательностях можно использовать для создания зондов, позволяющих клонировать человеческие гены. Это был трудоемкий процесс, но он позволил создать конструкции, содержащие человеческие гены, «внедренные» векторы для различных рекомбинантных систем экспрессии, которые продолжали совершенствоваться.

После первой экспрессии рекомбинантного продукта в *E. coli*, которая была продемонстрирована в 1976 году, когда ученые Genentech произвели человеческий белок соматостатин [4], системы производства белка, использующие бактерии, продолжали развиваться. Начали разрабатываться системы экспрессии эукариотических белков, включая культуру клеток насекомых, в которой используется бакуловирус [5], и систему экспрессии дрожжей *Pichia pastoris* [6], что дает возможность для продукции гликозилированных белков.

Доступ к коммерческим реагентам для молекулярного клонирования в сочетании с все более широким использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) [7] для амплификации генов в течение 1990-х годов еще больше ускорили внедрение этих систем экспрессии в фармацевтической промышленности. Одним из ключевых достижений начала 90-х годов стала разработка векторной системы рЕТ на основе *lac*-репрессора и промотора бактериофага T7 для экспрессии в *E. coli* [8], которая обеспечила платформу для бактериальной экспрессии, ставшую стандартной «рабочей лошадкой» первой линии для производства белка.

Бактериальная экспрессия была важна не только для биохимических исследований и рентгеновской кристаллографии, но и для развивающейся области ядерно-магнитной

резонансной спектроскопии белков (ЯМР) для определения структуры и скрининга лигандов, для которых необходимы белки, меченные изотопами. Разработка сред для роста *E. coli* с использованием контролируемых источников азота и углерода, а также способность расти в присутствии дейтерия, сыграли важную роль в реализации этой методологии [9, 10]. Однако технологии часто мешали низкие уровни экспрессии и необходимость культивирования в больших объемах для производства необходимых количеств белка.

Дальнейшие разработки в 90-е годы привели к использованию аутотрофных штаммов *E. coli*, что снизило потребность в дейтерировании [11]. К концу 90-х разработка специальных сред позволила производить меченный изотопами белок с более высокими выходами для структурных исследований с использованием ЯМР.

За последнее десятилетие лаборатории по всему миру выделили и очистили десятки тысяч различных белков из эубактерий и архей и тысячи из эукариот, включая белки грибов, нематод, растительные и человеческие белки, относящиеся к различным классам, включая белки с разнообразной структурой, интегральные мембранные белки и мультибелковые комплексы. На данный момент практически полный их список доступен в базе данных TargetDB, которая поддерживается Protein Data Bank (PDB) под эгидой Национального института общих медицинских наук США (NIGMS). Количественные данные по выделенным из живых организмов белкам приведены ниже (Таблица 1).

Таблица 1 – Распределение выделенных целевых белков, очищенных и не очищенных, по группам живых организмов, согласно базе данных TargetDB [12]

Группа организмов	Целевые белки, шт.	Очищенные белки, шт.
Вирусы	335	118
Археи	8,043	2,917
Эубактерии	58,806	17,350
Эукариоты	42,239	8,008

На сегодняшний день более 130 рекомбинантных белков одобрены FDA США для клинического использования, а во всём мире производятся и используются более 170 рекомбинантных белков, а такие белки, как рекомбинантные антитела, составляют приблизительно одну треть от общего количества белков, используемых в терапии различных заболеваний в развитых странах [1, 13].

Несмотря на достаточно высокий уровень развития данной технологии, в области производства и изучения рекомбинантных белков всё ещё много нерешённых проблем: где эффективнее наращивать белок для коммерческих и научных целей - в бактериях, дрожжах, клетках насекомых или клетках человека? Какой вектор для экспрессии следует использовать? Если используется бактериальная экспрессия, какой штамм следует выбрать? Стоит ли экспрессировать полноразмерный белок или только лишь фрагмент? Как «пометить» продуцируемый белок и какая аффинная метка лучше? Какая стратегия очистки наиболее выгодна? Однако, учитывая то, что каждый белок уникален, мы должны понимать, что невозможно найти единственно верный ответ на целый ряд возникающих вопросов, а протоколы и стратегии очистки должны быть разработаны для каждого отдельного белка индивидуально с учетом его предполагаемого использования. При этом при выборе стратегии очистки нужно руководствоваться многочисленными тенденциями, вероятностями и предостережениями, основанными на фактах, которые появились в результате крупномасштабных исследований структурной геномики и протеомики.

Также некоторые проблемы, связанные с несовершенствами рекомбинантной технологии, вероятно, будут разрешены в ближайшее время. К примеру, German L. Rosano и Eduardo A. Sessaгelli из Института молекулярной и клеточной биологии, в городе Росарио в Аргентине, опубликовали небольшое руководство, как бороться с некоторыми пробле-

мами и совершенствовать процесс создания рекомбинантных протеинов с помощью *E. coli*, сделав его более эффективным [14]. Стоит отметить, что в целом интерес к данной теме в научной среде достаточно высок.

Сейчас антитела являются широко используемым инструментом для научных и клинических исследований. Во многих случаях использование в практической деятельности рекомбинантных антител и их фрагментов имеет ряд преимуществ в сравнении с применением полноразмерных антител. Благодаря использованию генно-инженерных подходов, позволяющих изменять аминокислотную последовательность антител, можно улучшать такие характеристики антител, как аффинность, стабильность, фармакокинетические параметры, специфичность, иммуногенность. Модифицируя вышеупомянутые свойства антител и некоторых других рекомбинантных белков, можно создавать новое поколение перспективных белковых молекул с улучшенными свойствами для решения научно-исследовательских задач и практической медицины.

Перспективы увеличения аффинности антител связаны, прежде всего, с получением антител к тем антигенам, которые потенциально могут представлять интерес для терапии заболеваний человека, а также с созданием высокоаффинных антител, чья способность к связыванию может достигать 10^{-12} М и 10^{-15} М. Таким образом, в обозримом будущем создание антител с гораздо более высокой аффинностью, чем у ныне существующих, позволит расширить сферу применения рекомбинантных белков в научных исследованиях, диагностике и в качестве высокоспецифичных и высокоэффективных терапевтических агентов.

Область биотехнологии, связанная с рекомбинантными белками, постоянно расширяется, и даже спустя почти 40 лет после получения первого человеческого белка, полученного биотехнологическими методами, всё ещё есть много возможностей для развития.

Список литературы:

1. Barh D., Azevedo V. Omics Technologies and Bio – engineering: Towards Improving Quality of Life, Volume 1. – NY: Academic Press, 2017. – 618 p.
2. Gileadi O. Recombinant Protein Expression in *E. coli*: A Historical Perspective // Methods in Molecular Biology. – 2017. – Vol. 1586. – P. 3 – 10.
3. Niall H.D. Automated Edman degradation: The protein sequenator // Methods in Enzymology. – 1973. – Vol. 27. – P. 942 – 1010.
4. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A.D., Heyneker H.L., Bolivar F. et al. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin // Science. – 1977. – Vol. 198, №4321. – P. 1056 – 1063.
5. Smith G.E., Summers M.D., Fraser M.J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector // Molecular and Cellular Biology. – 1983. – Vol. 3, №12. – P. 2156 – 2165.
6. Cregg J.M., Vedvick T.S., Raschke W.C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* // Biotechnology. – 1993. – Vol. 11, №8. P. 905 – 910.
7. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T. et al. Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. – 1988. – Vol. 239, №4839. – P. 487 – 491.
8. Dubendorff J.W., Studier F.W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with Lac repressor // Journal of Molecular Biology. – 1991. – Vol. 219, №1. – P. 45 – 59.
9. Bax A., Ikura M. An efficient 3D NMR technique for correlating the proton and ^{15}N backbone amide resonances with the alpha – carbon of the preceding residue in uniformly $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ enriched proteins // Journal of Molecular Biology. – 1991. – Vol. 1, №1. – P. 99 – 104.
10. Gräslund S., Nordlund P., Weigelt J., Hallberg B. M., Bray J., Arrowsmith C. et al. Protein production and purification // Nature Methods. – 2008. – Vol. 5, №2. – P. 135 – 146.

11. Waugh D.S. Genetic tools for selective labeling of proteins with alpha – 15N – amino acids // *Journal of Molecular Biology*. – 1996. – Vol. 8, №2. – P. 184 – 192.

12. Structural Biology Knowledgebase SBKB. Available at: <http://targetdb.pdb.org> (accessed 25 March 2021) (in English).

13. Hagemeyer C.E., von Zur Muhlen C., von Elverfeldt D., Peter K. Single – chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2009. – Vol. 101. – P. 1012 – 1019.

14. Rosano G.R., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 1 – 17.

СОВРЕМЕННЫЕ ДАННЫЕ И КЛАССИЧЕСКИЕ ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ТЕОРИИ СТАРЕНИЯ

Попова М.А.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

Одна из главных неразгаданных загадок биологии - эволюция старения. Остается выяснить, почему в животном мире существует такое разнообразие в продолжительности жизни и почему старение вообще эволюционировало. Интуитивно можно ожидать, что такой вредный процесс, как старение, который уменьшает приспособленность и увеличивает смертность, будет благоприятствовать естественному отбору. Концепция эволюции старения была введена в литературу в 1930 году Рональдом Фишером. Благодаря Фишеру и новаторским мыслителям, таким как Питер Медавар, Джордж Уильямс, Уильям Гамильтон, Томас Кирквуд и другим, существуют убедительные эволюционные теории, которые помогают объяснить, почему эволюционировало старение, а также многие из наблюдаемых различий в продолжительности жизни между различными видами. Согласно этим классическим теориям, внешняя смертность (например, хищничество, болезни, голод, несчастные случаи) является основным эволюционным фактором того, как быстро или медленно организм будет стареть. Поскольку большинство животных в дикой природе не доживут до старости из-за суровых условий жизни, эволюционное давление, способствующее генетическим изменениям, замедляющим старение и увеличивающим продолжительность жизни, практически отсутствует. Например, у диких мышей основной причиной смертности является холодная температура, и более 90% мышей умирают в первый год жизни. По этим причинам, как правило, должно быть сильное эволюционное давление, чтобы стимулировать гены, которые способствуют раннему выживанию и более быстрому размножению. В животном мире существуют радикальные различия в продолжительности жизни. В то время как океанский кит может прожить полмиллиона лет, бабочка поденка живёт менее 48 часов. Эволюционные теории старения стремятся объяснить, почему существуют такие резкие различия в продолжительности жизни и почему развился такой пагубный процесс, как старение. Классические теории накопления мутаций, антагонистической плейотропии и одноразовой сомы предсказывают, что повышенная внешняя смертность должна выбрать для эволюции более короткую продолжительность жизни и наоборот [1]. Большинство экспериментальных и сравнительных полевых исследований соответствуют этому прогнозу. Действительно, животные с экстремальным долголетием (например, гренландская акула, гренландский кит, гигантская черепаха, трубчатые черви) обычно подвержены минимальному хищничеству. Однако данные, полученные на гуппи, нематодах и вычислительных моделях, показывают, что повышенная внешняя смертность иногда может привести к увеличению продолжительности эволюционировавшей жизни [2]. Существование теоретически бессмертных животных, которые испытывают внешнюю смертность, – таких как плоские черви, черви – пантеры и гидры - еще больше бросает вызов классическим предположениям. Осьминоги представляют собой еще одну загадку, демонстрируя короткую продолжительность жизни и сверхъестественный интеллект, который часто ассоциируется с долголетием и снижением внешней