

жүріп жатыр. Глутатион мен фитохелатиндердің синтезіне қатысатын ферменттің γ -глутамил-Цис-синтеазаның гендерінің манипуляциясы өсімдіктердің ауыр металдарға тұрақтылығын және олардың металл жинақтайтын қабілетін жоғарылатуға жол береді. Фитохелатинсинтазаның синтезінің гені шектейтін факторға жатпайды, себебі ол конститутивті болып келеді. Глутатионнің синтезін реттелуі ауыр металдардың жинақталуына және тұрақтылығына әсер етеді. Трансгендік өсімдік алу үшін глутатион-S-трансфераза ферментін қолдану мүмкіндігі туралы әдебиеттер келтірілген.

УДК 577.21

Ш.А. Атамбаева

СВОЙСТВА ОНКОГЕНОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Проанализировано шесть генов, участвующих в развитии рака молочной железы, в работе предложен ряд праймеров для отдельных экзонов и групп экзонов данных онкогенов.

Рак молочной железы является ведущей причиной смерти во всех индустриальных странах. В Казахстане рак молочной железы также становится серьезной проблемой. В Казахстане наблюдается увеличение случаев этого заболевания в среднем на 1–2 процента в год. Среди женщин рак молочной железы занимает первое место среди всех онкозаболеваний, причиной высокой смертности из-за данного заболевания является позднее выявление и слабая диагностика. На развитие РМЖ влияют множество факторов, такие как стресс, экология, гормональные заболевания, а также существует и наследственная форма данного заболевания.

Наиболее значимые молекулярные маркеры при раке молочной железы это BRCA1 и BRCA2, TP53, CDH1, HER-2, EGFR, CXCR4, ERK1/2. CXCR4 является G-белок-сопряженным рецептором, который связан с метастазами в некоторых видах рака, включая рак молочной железы. Недавно было показано, что высокие уровни CXCR4 в первичной опухоли больных раком молочной железы имеют прогностическое значение. Установлено, что у пациентов, у которых в опухолях гиперэкспрессия CXCR4 после неoadьювантной химиотерапии находится на низком уровне, будет меньше рецидивов, чем у тех, в чьих опухолях остается на высоком уровне [1].

Ранее было проанализировано прогностическое значение экспрессии EGFR для пациентов с тройным негативным раком молочной железы (ТНР). Клинические данные этих пациентов были собраны и проанализированы, было показано, что в 36,2% случаях с ТНР экспрессия EGFR была высокой [2, 3].

Гиперэкспрессия HER-2, происходящая в 25-30% рака молочной железы человека. В нормальном состоянии рецептор HER2 располагается на поверхности многих клеток организма. Примерно у каждой четвертой женщины, больной РМЖ, количество этого белка в клетках опухоли повышено по сравнению с нормой. Избыточное количество этого рецептора на поверхности раковых клеток свидетельствует о высокоагрессивной форме РМЖ. Исследования локализации показали, что гиперэкспрессированная мРНК ERK1/2 локализована в злокачественных эпителиальных клетках. Кроме того, гиперэкспрессия мРНК ERK1/2 (5-20 раз) наблюдалась также в метастатических клетках лимфатических узлов больных раком молочной железы [4].

Выявление молекулярных маркеров и их изоформ имеет важное значение для ранней диагностики рака молочной железы, поскольку именно ранняя диагностика является залогом успешного лечения заболевания.

Материалы и методы

Для создания базы данных по генам участвующим в развитии РМЖ использовали такие базы данных как «Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology» и «GenBank». Для каждого онкогена была составлена краткая аннотация, которая содержала: расшифровку аббревиатуры на английском языке, синонимические названия гена, код GenBank, локализацию гена в хромосоме, число экзонов в гене и количество изоформ (если таковые имеются). Праймеры находили на основе экзон-интронной структуры генов. Учитывались как известные изоформы пре-мРНК, так и предполагаемые. Праймеры для отдельных экзонов и групп экзонов подбирали из расчета получения кДНК длиной не более 1000 нуклеотидов.

Результаты и их обсуждение

Было создано две группы онкогенов, участвующие в развитии РМЖ. В первую группу вошли онкогены: *IRIS, PSCP; BRCA1; BRCC1; RNF53; BROVCA1; BRCA1*. Свойства онкогенов первой группы ранее были изучены [5]. Вторая группа была сформирована из следующих онкогенов: *AKT1S1, ALOX5, CXCR4, EGFR, ERBB2, MAPK3*.

AKT1S1 - *AKT1* substrate 1 (proline-rich) (*Lobe*, *MGC2865*, *PRAS40*) NC_000019.9, локализация 19q13.33, ген имеет 4 экзона. Для него нами предложено 5 пар праймеров. *ALOX5* - Arachidonate 5-Lipoxygenase (*5-LO*; *EC 1.13.11.34*; *leukotriene A4 synthase*; *5LPG*; *LOG5*) NC_000010.10, локализация 10q11.2, ген состоит из 14-ти экзонов. Для гена *ALOX5* было предложено 3 пары праймеров. *AXIN2* - axin 2 (*axil*, *conductin* *DKFZp781B0869*, *MGC126582*), NC_000017.10, локализация 17q24.1, ген состоит из 10-ти экзонов. Для данного гена было предложено 4 пары праймеров. *CXCR4* - chemokine (C-X-C motif) receptor 4, (*CD184*; *D2S201E*; *FB22*; *HM89*; *HSY3RR*; *LAP3*; *LCR1*; *LESTR*; *NPY3R*; *NPYR*; *NPYRL*; *NPYY3R*; *WHIM*), NC_000002.11, локализация 2q22.1, ген имеет 2 изоформы, изоформа 1 имеет 2 экзона, изоформа 2 имеет 1 экзон. Для каждой изоформы данного гена было предложено по 1-й паре праймеров. *CXCR4* является предиктивным молекулярным маркером ответа на неоадьювантную химиотерапию у пациентов с местно-распространенным раком молочной железы. У пациентов у которых в опухолях был постоянно высокий уровень гиперэкспрессии *CXCR4* после неоадьювантной терапии, существует значительный риск рецидива, и, следовательно, должны быть направлены для более интенсивной и/или новой терапии. *EGFR* - epidermal growth factor receptor (*ERBB*; *ERBB1*; *HER1*; *PIG61*; *mENA*), NC_000007.13 локализация 7p11.2, ген имеет 4 изоформы. Изоформа 2 и 3 имеют по 16 экзонов, а изоформы 1 и 4 состоят из 28-ми и 4-х экзонов соответственно. Для изоформы 1, 2, 3 и 4 было предложено по 6, 4, 3 и 2 пар праймеров. Гиперэкспрессия *EGFR/HER-1* встречается в 14–91% случаев РМЖ и связана с высоким уровнем метастазирования. В настоящее время прогностическая значимость *EGFR* не до конца изучена, по некоторым данным высокие уровни *EGFR* не являются предикторами эффективности лечения, а степень ингибирования *EGFR*, индуцированного лекарственным препаратом не определяет ответ на терапию. *ERBB2* - erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian) (*v-erb-b2*; *HER2*; *NEU*; *TKR1*; *NGL*; *Her-2/neu*; *C-erbB-2*), NC_000017.10 локализация 17q21.1, ген имеет 2 изоформы, в изоформе 1 – 27 экзонов, в изоформе 2 – 26. *Her-2* гиперэкспрессия встречается в 20–25% больных РМЖ и входит в состав семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека (Human Epidermal Growth Factor receptors (*HER/erbB*), включающего *EGF* рецепторы (*EGFR*, *HER-1*, *erbB1*, *HER-2/neu* (*erbB-2*), *HER-3* (*erbB-3*) и *HER-4* (*ErbB-4*)). Молекулы семейства *HER* (*ErbB*) вовлечены в патогенез многих опухолей, в том числе и РМЖ, а уровни их экспрессии нередко определяют прогноз данного заболевания. *MAPK3* - mitogen-activated protein kinase 3 (*EC 2.7.11.24*; *ERK1*; *ERK-1*; *ERT2*; *HS44KDAP*; *HUMKER1A* *MAPK 1* *MGC20180* *PRKM3* *P44ERK1* *P44MAPK* *p44-ERK1* *p44-MAPK*), NC_000016.9, локализация 16p11.2, ген имеет 3 изоформы, изоформа 1 имеет 8 экзонов, а изоформы 2 и 3 состоят из 7 экзонов.

Таблица 1

Праймеры для генов, участвующих в развитии рака молочной железы

Ген (длина, п.н.)	Смысловая	Антисмысловая
<i>AKT1S1</i> (771)		
Экзоны (1) 379	5'-ATGGCGTCGGGGCGCCCCGA-3'	5'-CTCCATTATCACTAATGCCC-3'
Экзоны (2-4) 392	5'-GGCTCTTTGTGATGGATGAG-3'	5'-TCAATATTTCCGCTTCAGCT-3'
<i>ALOX5</i> (2025)		
Экзоны (1-4) 554	5'-ATGCCCTCCTACACGGTCAC-3'	5'-GCTTTGGAGTAATTCAGAAC-3'
Экзоны (5-8) 631	5'-GATGGAGAACCTGTTTCATCA-3'	5'-CTTGAAAATGGGGTGACAG-3'
Экзоны (9-14) 840	5'-CTGCTGGTGGCACACGTGAG-3'	5'-TCAGATGGCCACACTGTTTCG-3'
<i>AXIN2</i> (2532)		
Экзоны (1) 815	5'-ATGAGTAGCGCTATGTTGGT-3'	5'-CTGTATCCACTGTCAACAGT-3'
Экзоны (2-4) 385	5'-GTCCTTCAAGAGGAGCGATC-3'	5'-CTCTCGGATCTGCTGCAGGC-3'
Экзоны (5) 512	5'-GATGAAGAGAGAGAGGGCTC-3'	5'-CCAAACTGCTCGCTGGGCAT-3'
Экзоны (6-10) 820	5'-CGGCAGCAGAGGCAGTACCT-3'	5'-TCAATCGATCCGCTCCACTT-3'
<i>CXCR4</i> (isoform 1) (1059)		
Экзоны (1-2) 1059	5'-ATGGAGGGGATCAGTATATA-3'	5'-TTAGCTGGAGTGAAAACCTG-3'
<i>CXCR4</i> (isoform 2) 1071		
Экзоны (1) 1071	5'-ATGTCCATTTCCTTGCCTCT-3'	5'-TTAGCTGGAGTGAAAACCTG-3'
<i>EGFR</i> (isoform 1) 3633		
Экзоны (1-4) 559	5'-ATGCGACCCTCCGGGACGGC-3'	5'-AGCTGCCAGGTGGTTCTGG-3'

Экзоны (5-9) 574	5'-GCCAAAAGTGTGATCCAAGC-3'	5'-GGGGATTACGGTGGCCGTC-3'
Экзоны (10-14) 589	5'-TGACTCCTTCACACATACTC-3'	5'-GGCAGGACACGTCCACTACA-3'
Экзоны (15-19) 561	5'-GGACCAGACAACCTGTATCCA-3'	5'-ATCGAGGATTCCTTGTGG-3'
Экзоны (20-23) 565	5'-GAAGCCTACGTGATGGCCAG-3'	5'-ACTTGACCATGATCATGTAG-3'
Экзоны (24-28) 785	5'-GCTGGATGATAGACGCAGAT-3'	5'-TCATGCTCCAATAAATTCAC-3'
<i>EGFR</i> (isoform 2) 2118		
Экзоны (1-4) 559	5'-ATGCGACCCTCCGGGACGGC-3'	5'-AGCTGCCCAGGTGGTTCTGG-3'
Экзоны (5-9) 574	5'-GCCAAAAGTGTGATCCAAGC-3'	5'-CCCCTAAATGCCACCGGCAG-3'
Экзоны (10-14) 589	5'-TGACTCCTTCACACATACTC-3'	5'-CCGTCCTGTGCAGGTGATGT-3'
Экзоны (15-16) 396	5'-GGACCAGACAACCTGTATCCA-3'	5'-TCAGTGGCAGGAGGAGGCCG-3'
<i>EGFR</i> (isoform 3) 1887		
Экзоны (1-4) 559	5'-ATGCGACCCTCCGGGACGGC-3'	5'-AGCTGCCCAGGTGGTTCTGG-3'
Экзоны (5-9) 574	5'-GCCAAAAGTGTGATCCAAGC-3'	5'-CCCCTAAATGCCACCGGCAG-3'
Экзоны (10-16) 754	5'-TGACTCCTTCACACATACTC-3'	5'-TTAGGACCCGTAGGTGCAGT-3'
<i>EGFR</i> (isoform 4) 1218		
Экзоны (1-4) 559	5'-ATGCGACCCTCCGGGACGGC-3'	5'-AGCTGCCCAGGTGGTTCTGG-3'
Экзоны (5-10) 659	5'-GCCAAAAGTGTGATCCAAGC-3'	5'-TCAGCTCAAACCTGTGATT-3'
<i>ERBB2</i> (isoform 1) 3768		
Экзоны (1-4) 574	5'-ATGGAGCTGGCGGCCTTGTG-3'	5'-GTGGTTGGCGAGAGCCCGGA-3'
Экзоны (5-9) 574	5'-GCCACCCCTGTTCTCCGATG-3'	5'-CCATCAAAGCTCTCCGGCAG-3'
Экзоны (10-14) 589	5'-GGACCCAGCCTCCAACACTG-3'	5'-CGGTCCAAAACAGGTCACTG-3'
Экзоны (15-19) 570	5'-GAGGCTGACCAGTGTGTGGC-3'	5'-GTCTAAGATTTCTTTGTGG-3'
Экзоны (20-23) 563	5'-GAAGCATACTGATGGCTGG-3'	5'-ATTTGACCATGATCATGTAG-3'
Экзоны (24-27) 896	5'-GTTGGATGATTGACTCTGAA-3'	5'-TCACACTGGCACGTCCAGAC-3'
<i>ERBB2</i> (isoform 2) 3678		
Экзоны (1-4) 553	5'-ATGAAGCTGCGGCTCCCTGC-3'	5'-GGCTCTGACAATCCTCAGAA-3'
Экзоны (5-9) 579	5'-TGACGCGCACTGTCTGTGCC-3'	5'-CTGTGATCTCTTCCAGAGTC-3'
Экзоны (10-13) 515	5'-GTTACCTATACATCTCAGCA-3'	5'-CGGTCCAAAACAGGTCACTG-3'
Экзоны (14-18) 570	5'-GAGGCTGACCAGTGTGTGGC-3'	5'-GTCTAAGATTTCTTTGTGG-3'
Экзоны (19-22) 565	5'-GAAGCATACTGATGGCTGG-3'	5'-ATTTGACCATGATCATGTAG-3'
Экзоны (23-26) 896	5'-GTTGGATGATTGACTCTGAA-3'	5'-TCACACTGGCACGTCCAGAC-3'
<i>MAPK3</i> (isoform 1) 1008		
Экзоны (1-3) 543	5'-ATGGCGGCGGCGGCGGCTCA-3'	5'-CTTAAGGTCGCAGGTGGTGT-3'
Экзоны (4-7) 465	5'-ATTTGTGATTTTCGGCCTGGC-3'	5'-CTAGGGGGCCTCCAGCACTC-3'
<i>MAPK3</i> (isoform 2) 1140		
Экзоны (1-3) 543	5'-ATGGCGGCGGCGGCGGCTCA-3'	5'-CTTAAGGTCGCAGGTGGTGT-3'
Экзоны (4-8) 597	5'-ATTTGTGATTTTCGGCCTGGC-3'	5'-CTAGGGGGCCTCCAGCACTC-3'
<i>MAPK3</i> (isoform 3) 1074		
Экзоны (1-3) 543	5'-ATGGCGGCGGCGGCGGCTCA-3'	5'-CTTAAGGTCGCAGGTGGTGT-3'
Экзоны (4-7) 531	5'-ATTTGTGATTTTCGGCCTGGC-3'	5'-CTACGTGCCCCCTGCTCCC-3'

Экзон-интронное строение генов дало принципиально новую возможность для эволюции генов — комбинировать отдельные элементы при формировании генов. В результате этого в эволюции возникали новые гены, кодирующие разные белки за счет разного сочетания экзонов одного и того же гена [6]. Известно, что нарушение альтернативного сплайсинга является одной из причин возникновения опухолевых заболеваний. В связи с этим, нами предложены праймеры предназначены для выявления полиморфизма продуктов экспрессии за счет альтернативного сплайсинга. Данные праймеры, могут использоваться для диагностики онкозаболеваний различной локализации, в том числе и для РМЖ.

- 1 Hassan S., M. Buchanan, K. Jahan et al. CXCR4 peptide antagonist inhibits primary breast tumor growth, metastasis and enhances the efficacy of anti-VEGF treatment or docetaxel in a transgenic mouse model // International Journal of Cancer.- 12 nov.- 2010.
- 2 Chong K, Subramanian A, Sharma A, Mokbel K, et al. Measuring IGF-1, ER- α and EGFR Expression Can Predict Tamoxifen-resistance in ER-positive // Breast Cancer.Anticancer Res.- 2011.- №31.- P. 23-32;
- 3 Liu, J. He, Zh. Yuan et al. EGFR expression correlates with decreased disease-free survival in triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray // Med Oncol. January.- 2011.
- 4 Zhang H, Jin F. HER-2 Expression Correlates with Survivin in Primary Invasive Ductal Breast Cancers. // Asian Pac J Cancer Prev. 201. - №11(5).- P.1201
- 5 Атамбаева Ш.А., Иващенко А.Т. Свойства генов, участвующих в развитии рака молочной железы. // Вестник КазНУ им.аль-Фараби. Серия биол. - 2010.- №3(45). - С.33-39.
- 6 Тарантул В.З Геном человека: Энциклопедия, написанная четырьмя буквами. - М.: Языки славянской культуры, 2003. -С. 396.

Сүт безі ісігінің дамуына қатысатын алты ген зерттелген, бұл жұмыста осы онкогендердің жеке экзондарға және экзондардың топтарға праймерлері табылды.

It is analyzed six genes, participating in development of a breast cancer, for this oncogenes a number primers for separate exons and groups exons in work is offered.

УДК 577.21

А.А. Бари, В.А. Хайленко, А.Т. Иващенко

ХАРАКТЕРИСТИКИ СВЯЗЫВАНИЯ miR414 С mRNA ГЕНОВ ХРОМОСОМЫ 4 *Arabidopsis thaliana*

(Казакский национальный университет имени аль-Фараби)

Выявлены характеристики связывания miR414 с mRNA 236 генов хромосомы 4 Arabidopsis thaliana. Установлены существенные отличия mRNA изученных генов по числу сайтов связывания и энергии взаимодействия с miR414.

МикроРНК (miRNA) растений изучены в меньшей степени, чем miRNA животных, однако интерес к ним постоянно растет и благодаря этому получают все больше новых данных о их роли в биологических процессах растений [1-5]. Показано участие miRNA в регуляции развития, роста, дифференцировки, апоптоза [6-10]. Экспрессия многих miRNA изменяется при реакции растений на абиотические и биотические виды стресса: засуха, температура, тяжелые металлы, токсины, патогены и т.д. [11-20].

В большинстве публикаций по изучению miRNA выявлялись корреляции между увеличением или уменьшением их концентрации при различных воздействиях на растения, либо в связи с процессами онтогенеза. Такая информация важна, однако еще мало изучено действие miRNA на конкретные mRNA генов-мишеней. Учитывая, что влияние miRNA на различные процессы осуществляется посредством действия на mRNA, то очевидна необходимость выявления генов-мишеней каждой miRNA. Эта задача является сложной, поскольку поиск в лаборатории генов-мишеней для miRNA требует значительного времени и больших материальных затрат. Сложность задачи заключается и в том, что для одной miRNA, как правило, имеется несколько или даже десятки генов-мишеней, а для одного гена несколько miRNA, связывающихся с соответствующей mRNA.

С помощью методов биоинформатики созданы базы данных о предполагаемых miRNA и их генах-мишенях (miRBase <http://www.mirbase.org>). Однако, даже в полностью секвенированных и аннотированных геномах *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa* выявляют новые miRNA и новые белок-кодирующие гены. Кроме этого, известные методы предсказания генов-мишеней для miRNA имеют определенные недостатки и требуется создание более совершенных компьютерных программ и методических подходов для выявления мишеней для miRNA.

К началу выполнения настоящей работы было известно более 300 генов miRNA *A. thaliana*. Среди этих miRNA для miR414 было известно наибольшее число генов-мишеней равное 100, что послужило причиной с помощью новых методических подходов дать характеристику сайтов взаимодействия miR414 с mRNA соответствующих генов. В работе проведен поиск новых мишеней для miR414 и установлены характеристики взаимодействия этой miRNA с mRNA генов *A. thaliana*.

Материалы и методы

В качестве материала использованы нуклеотидные последовательности mRNA 4122 генов хромосомы 4 *A. thaliana*, которые были взяты из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидная