



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.25

(51) Int. Cl. **C07K 14/435** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201300880

(22) Дата подачи заявки
2012.02.02

(54) ГЕН R2R1/2 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ СЕРДЕЧНЫХ И ЛЕГОЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ИЛИ СОСТОЯНИЙ, А ТАКЖЕ РАКА

(31) 11250127.5

(32) 2011.02.03

(33) EP

(43) 2014.02.28

(86) PCT/IB2012/000177

(87) WO 2012/127289 2012.09.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АКАДЕМИС ЗИКЕНХЕЙС ЛЕЙДЕН
А/Ю ЛЕЙДЕН ЮНИ МЕДИКАЛ КТР
(NL); ЖАНСЕН ФАРМАСЕТИКА НВ
(BE)**

(72) Изобретатель:
**Арсенс Ерун Марсел Мария Рогер
(BE), Ван Бремт Роналд Карел Луиза
(NL), Петерс Питер Йохан, Де Хогт
Роналд Антониус (BE), Де Рейтер
Маркус Корнелис (NL)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) DATABASE Geneseq [Online] 13 November 2008 (2008-11-13), "Crohn's disease associated polypeptide SEQ ID NO 761.", XP002655012, retrieved from EBI accession no. GSP:ATK90136 Database accession no. ATK90136 sequence & WO 2008/067195 A2 (GENIZON BIOSCIENCES INC

[CA]; BELOUCHI ABDELMAJID [CA]; RAELSON JOHN V) 5 June 2008 (2008-06-05) sequence 761 DATABASE Geneseq [Online] 5 March 2009 (2009-03-05), "Human schizophrenia related amino acid sequence SEQ ID:929.", XP002655013, retrieved from EBI accession no. GSP:AUZ53610 Database accession no. AUZ53610 sequence 6 WO 2008/112177 A2 (GENIZON BIOSCIENCES INC [CA]; BELOUCHI ABDELMAJID [CA]; RAELSON JOHN V) 18 September 2008 (2008-09-18) sequence 929

DATABASE Geneseq [Online] 10 July 2008 (2008-07-10), "DNA fragments of a human Tox gene, 44680.", XP002655017, retrieved from EBI accession no. GSN:ARC00629 Database accession no. ARC00629 sequence

DATABASE UniProt [Online] 3 March 2009 (2009-03-03), "SubName: Full=Novel protein;", XP002655018, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:B8A4K4 Database accession no. B8A4K4 sequence

LIN ET AL.: "Misexpression of MIA disrupts lung morphogenesis and causes neonatal death", DEVELOPMENTAL BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 316, no. 2, 15 February 2008 (2008-02-15), pages 441-455, XP022576117, ISSN: 0012-1606 the whole document

NG Y-S ET AL.: "Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult", DEVELOPMENTAL DYNAMICS, vol. 220, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 112-121, XP002655177, ISSN: 1058-8388 the whole document

(57) Изобретение относится к применению полинуклеотида, содержащего регенеративный ген для респираторных клеток R2R^{1/2}, применению белка, кодируемого геном R2R^{1/2}, применению антисмыслового олигонуклеотида, способного модулировать экспрессию гена R2R^{1/2}, применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способных к связыванию с белком, кодируемым геном R2R^{1/2}, и к соответствующим фармацевтическим композициям для лечения сердечных и легочных заболеваний или состояний, а также рака. Кроме того, изобретение относится к способу диагностики указанных заболеваний или состояний, основанному на выявлении уровня экспрессии гена R2R^{1/2}, и способу тестирования соединения на способность модулировать экспрессию гена R2R^{1/2}. Изобретение также относится к животной модели для исследования сердечного и легочного заболеваний или состояний, а также рака.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение обеспечивает новые гены, поддерживающие развитие/сохранение тонкой трехмерной архитектуры легких, а также медикаменты и композиции для лечения заболеваний и/или состояний легких.

Предшествующий уровень техники

Экспрессия генов промежуточного филамента (Krt6), EDC (комплекса эпидермальной дифференцировки) и SCC (генного комплекса белков, секретируемых многослойным эпителием) обеспечивает выживание клеток в неблагоприятном окружении. Этот профиль экспрессии приводит к плоскоклеточной дифференцировке, и является признаком эпителиальных клеток кожи. Авторы изобретения установили, что эта программа транскрипции также является жизненно важной для доработки легочной архитектуры (позднего морфогенеза ветвления): клеткам в дистальных воздухоносных путях и кровеносных сосудах нужно приобрести плоскую форму и механическую гибкость в среде, богатой кислородом. Белки, кодируемые группой генов промежуточного филамента и связанных генов EDC и SCC, обеспечивают этот тип формы и гибкости клеток. В то же самое время, легким необходимо поддерживать клетки-предшественники, способные дифференцироваться в клетки, способные к синтезу белков. Эти предшественники или базальные клетки типично экспрессируют ген промежуточного филамента Krt14.

Легкие подвергаются сильному воздействию механического и окислительного стресса, и в этом отношении подобны коже. Программа плоскоклеточной дифференцировки, как упомянуто выше, является первичной линией защиты. Клетки, выстилающие дистальные воздухоносные пути и кровеносные сосуды легких, должны выдерживать этот стресс, и нуждаются в замене в случае клеточной гибели с помощью пула клеток-предшественников.

При нарушении этой системы возникают два вида патологий человека.

1. Бронхолегочная дисплазия (БЛД): легкие недоношенных новорожденных особо восприимчивы к повреждению легких, такому как механический стресс. Кроме того, легкие недоношенных новорожденных, перенесших повреждение легких, часто заживают с существенным рубцеванием или бронхолегочной дисплазией (БЛД). Такие легкие обладают ограниченным или недоразвитым регенеративным потенциалом.

2. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ): легкие взрослых больных ХОБЛ по всей видимости неадекватно отвечают на вредоносные стимулы, такие как курение. Хотя они развивают барьер против этих стимулов, отсутствие регенеративных способностей в случае гибели клеток ведет к деформации легочных воздухоносных путей и кровеносных сосудов. Как БЛД, так и ХОБЛ приводят к значительной заболеваемости и смертности.

Изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение основано на обнаружении того, что два гена играют важные роли в развитии тканей и биологии рака. В частности, авторы настоящего изобретения открыли, что эти два гена экспрессируются в клетках легких и необходимы для позднего морфогенеза легочного эпителия и эндотелия, и поддержки развития/сохранения тонкой трехмерной архитектуры легких. Эти гены необходимы в программе плоскоклеточной дифференцировки, и в развитии/сохранении клеточного пула предшественников (экспрессирующих Krt14). Далее, авторы настоящего изобретения установили критические роли этих генов в биологии рака, в частности в процессах, связанных с приобретением бессмертного и метастатического фенотипа (включая прогрессирование и метастазирование рака), и развитии сердца.

Авторы настоящего изобретения определили последовательности мышинных и человеческих форм этих генов. С учетом их координированной экспрессии и функции в качестве регенеративных генов для респираторных клеток, авторы изобретения обозначили эти гены как R2R¹ и R2R². Для простоты, в данном описании применение термина "R2R^{1/2}" предназначено для обозначения более длинного выражения "R2R¹ и/или R2R²".

Соответственно, необходимо понять, что ссылки на R2R^{1/2} охватывают все формы этих генов у млекопитающих, включая, например, формы человека и грызунов (мыши, кролика, морской свинки, крысы, и т.д.). Далее, в добавление к охвату всех последовательностей генов R2R¹ и/или R2R², необходимо понять, что эти обозначения также охватывают фрагменты, части, мутанты, производные и/или гомологи/ортологи любого из этих генов, описанных здесь. В этом отношении, необходимо понять, что термин "R2R¹" охватывает мышиную последовательность, закодированную кДНК последовательностями, обозначенными как 2200001115Rik или RIKEN кДНК 2200001115, а также семь человеческих гомологов, обозначенных как FAM25A, FAM25B, FAM25C, FAM25D, FAM25E, FAM25G и FAM25HP.

Кроме того, где это уместно, термин "R2R^{1/2}" охватывает белковые продукты генов R2R¹ и/или R2R², или их фрагменты или части.

В частности, термин "R2R^{1/2}", или любой из терминов "R2R¹" или "R2R²", охватывает последовательности, указанные в SEQ ID №:1-12 ниже, или их фрагменты, части, аналоги, варианты или производные.

Ниже приведена последовательность примерного транскрипта мышинного гена R2R¹ как SEQ ID №:1.

SEQ ID №: 1

Кодирующая или транслируемая часть этой последовательности выделена подчеркиванием и содержит примерно 426 нуклеотида. Эта конкретная часть SEQ ID №:7 обозначена как SEQ ID №:8.

Специалисту в данной области техники понятно, что 426 транслируемых нуклеотидов дают белок, содержащий 142 аминокислоты, и имеющий следующую последовательность (обозначенную SEQ ID №:9).

SEQ ID №:9

MDPHEMVVKNPYAHISIPRAHLRSDLGQQLEEVPSSSSSETQPLPAGTCIPEPVG
LLQTTEAPGPKGIKGIKGTAPENHQQTWQSPCNPYSSGQRPSGLTYAGLPPVGRGDDIA
HHCCCCPCCSCCHCPRFCRCHSCCVIS

Кроме того, авторы настоящего изобретения установили полную последовательность примерного человеческого транскрипта гена R2R², приведенного как SEQ ID №: 10 ниже.

SEQ ID №:10

cttgaaccgggagcagaggttgagcagccagatcgcgagctgactccagcctgggcaacagagcaagactccat
ctcagaaaagaagcagaaaagcctccaagagccaatggctctcaagcatcttggtctctgctaagaagaggctcagaggcttagaacct
gcctcgccggggctttgaggtgtgtgagcaatggctgggactgcaggcccgggaatctgagggcctaccccacttctttcagagcc
gtgacctcaggtcacctcctgcctcctcagggcaagctgcagatgcccttagggcccaggccatgccccggatgtgaggggctgagt
cactggtttggcagtgcccctcagagcccagcctgggctgccaccacactgaggacgagggtggccagctgtctgtcctcagttgct
ggggcctctgggatcttgggaacccatctctgagccccgcccATGGCCCCGCCCTCCCAAGGAGGGAAA
AGGCGGCTGCCAGTCGCTCAACTCAGGCACTGGGACCTAGAGCTCAGAAGACCGAG
AGGACAGACTGCCGTGTTGCCACCACAGGCTGGACCATGGACCCCCAAGAGATGGT
CGTCAAGAACCCATATGCCACATCAGCATCCCCGGGCTCACCTGCGGCCTGACCT
GGGGCAGCAGTTAGAGGTGGCTTCCACCTGTTCTCATCCTCGGAGATGCAGCCCCT
GCCAGTGGGGCCCTGTGCCCCAGAGCCAACCCACCTCTTGCAGCCGACCGAGGTCC
CAGGGCCCAAGGGCGCCAAGGGTAACCAGGGGGCTGCCCCATCCAGAACCAGCA
GGCCTGGCAGCAGCCTGGCAACCCCTACAGCAGCAGTCAGCGCCAGGCCGGACTGA
CCTACGCTGGCCCTCCGCCCCGCGGGGCGCGGGGATGACATCGCCCACCACTGCTGCT
GCTGCCCCCTGCTGCCACTGCTGCCACTGCCCCCCTTCTGCCGCTGCCACAGCTGCTG
CTGCTGTGTCATCTCCtagcccagcccaccctgccagggccagaccagacttcagcaaatgtgctcacacagtccc
ggacatgccgggacatcggggtggctgtgtcatgggctgtgcccttcacaccaggcactggggctcagaccaccaggaaggtgg
ccgttcagcccagctcctgaaacggaatcccaggtcctggctggagaggacaccctgattaccttaaggcccaggaataaagcag
ggtgatcttc

Кодирующая или транслируемая часть этой последовательности выделена подчеркиванием и содержит примерно 552 нуклеотида. Эта конкретная часть SEQ ID №: 10 обозначена как SEQ ID №: 11.

Специалисту в данной области техники понятно, что 552 транслируемых нуклеотида дают белок, содержащий 184 аминокислоты, и имеющий следующую последовательность (обозначенную SEQ ID №:12).

SEQ ID №:12

MAPPLPREKAAASRSTQALGPRAQKTERTDRCRVATTGDTMDPQEMVVKNPYA
HISIPRAHLRDLGQLEVASTCSSSEMQLPVGPCAPEPTHLLQPTEVPKPKGAKGNQ
GAAPIQNQAWQQPGNPYSSSRQAGLTYAGPPPAGRGDDIAHHCCCCPCCCHCCHCPP
FCRCHSCCCCVIS

Как таковое, настоящее изобретение относится к генам, кодируемым последовательностями, обозначенными как SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и/или 11, а также любым их фрагментам, частям, мутантам, вариантам, производным и/или гомологам/ортологам. Как правило, фрагменты, части, мутанты, варианты, производные и/или гомологи/ортологи являются функциональными или активными, то есть они сохраняют функцию генов R2R^{1/2} дикого типа.

Термин "мутанты" может охватывать встречающиеся в природе мутанты или искусственно созданные путем добавления, делеции, замещения или инверсии одной или нескольких аминокислот.

Специалисту в данной области техники понятно, что гены, гомологичные человеческим и мышечным

ным R2R^{1/2} генам, перечисленным выше, можно найти у ряда различных видов, включая, например, другие виды млекопитающих. Гомологичные гены могут обладать всего примерно 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологии с различными нуклеотидными последовательностями, приведенными выше. Как таковые, гомологичные гены от других видов подлежат включению в объем настоящего изобретения.

С применением различных нуклеиново-кислотных и аминокислотных последовательностей, описанных здесь, специалист в данной области техники может быстро идентифицировать родственные последовательности у других видов, таких как другие млекопитающие, и пр. Например, нуклеиновую кислоту, полученную у конкретных видов, можно исследовать с применением зондов, описанных здесь, для гомологичных или близкородственных последовательностей.

Кроме того, необходимо понять, что настоящее изобретение также относится к продуктам генов, охватываемых изобретением, и в частности, к пептидам, кодированным SEQ ID NO: 3, 6, 9 и 12. Кроме того фрагменты, части, аналоги, варианты, производные любых из них, или гомологи и/или идентичные белки также находятся в пределах объема настоящего изобретения. Как правило, фрагменты, части, производные, варианты и/или гомологи являются функциональными или активными, то есть они сохраняют функцию белка R2R^{1/2} дикого типа.

Кроме того, белки, полипептиды/пептиды, гомологичные/идентичные любым белкам, кодируемым SEQ ID NO:3, 6, 9 и 12, также находятся в пределах объема настоящего изобретения. Белковые или полипептидные/пептидные последовательности, считающиеся гомологичными или идентичными любой последовательности, описанной здесь, могут быть всего на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% гомологичными или идентичными. В той мере, в которой изобретение относится к фрагментам любой из белковых или полипептидных/пептидных последовательностей, описанных здесь, необходимо понять, что фрагмент может содержать любое число аминокислот, находящееся между 10 и n-1 аминокислотами (где "n" является числом аминокислот в полной последовательности). Например, фрагмент может содержать примерно 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 или около 125 аминокислот (максимальное число аминокислот определяется числом аминокислот в полной последовательности) - такие фрагменты/части могут обозначаться как пептидные фрагменты. В одном варианте осуществления пептидные фрагменты могут быть антигенными и/или иммуногенными -то есть, они сохраняют способность к связыванию с антителами, проявляющими специфичность, аффинность и/или селективность в отношении нативного (полного) антигена - такого как кодированный SEQ ID NO:3, 6, 9 и 12.

Специалисту в данной области техники понятно, что для различных нуклеиново-кислотных последовательностей и полипептидов, описанных здесь, могут существовать природные вариации, обусловленные, например, полиморфизмом, среди R2R^{1/2} генов и белков, выделенных у любых из имеющихся видов. Кроме того, в данной области техники хорошо известно, что вырожденность генетического кода обеспечивает замещение одного или нескольких оснований в кодоне без нарушения первичной аминокислотной последовательности. Как таковую, генетическую вырожденность можно применять для получения вариантов нуклеиново-кислотных последовательностей, кодирующих пептидные или белковые последовательности, по существу идентичные антигенным последовательностям, описанным здесь. Действительно, варианты последовательности, обеспеченные настоящим изобретением, могут проявляться как белки, и/или гены, которые содержат одну или несколько аминокислотных/нуклеиново-кислотных замен, добавлений, делеций и/или инверсий, по отношению к референсной последовательности (например, любой из последовательностей, описанных выше).

Таким образом, необходимо понять, что все такие варианты, в особенности те, что являются функциональными или проявляют необходимую активность, подлежат включению в объем настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления изобретение относится к производным любой из R2R^{1/2} последовательностей, описанных здесь. Термин "производные" может охватывать R2R^{1/2} гены или пептидные последовательности, которые, по сравнению с описанными здесь, содержат одну или несколько аминокислотных замен, делеций, добавлений и/или инверсий.

В дополнение или альтернативно, аналоги различных пептидов, описанных здесь, могут быть получены путем введения одной или нескольких консервативных аминокислотных замен в первичной последовательности. Специалисту в данной области техники понятно, что термин "консервативная замена" предназначен для охвата акта замещения одной или нескольких аминокислот в белке или пептиде альтернативной аминокислотой с подобными свойствами, и которая существенно не изменяет физико-химических свойств и/или структуры или функции нативного белка (или белка дикого типа). Аналоги данного типа также охватываются объемом настоящего изобретения.

Как хорошо известно в данной области техники, свойство вырожденности генетического кода позволяет заменить одно или несколько оснований в кодоне без изменения первичной аминокислотной последовательности. Соответственно, хотя последовательности, описанные в данной заявке, как известно, кодируют R2R^{1/2} белки, описанные здесь, вырожденность кода может применяться для получения вариантов последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих те же самые первичные аминокислотные последовательности.

Повторяем, что термины "R2R¹", "R2R²" и "R2R^{1/2}" охватывают не только полные генные/пептидные последовательности, как описано выше, но также их фрагменты, аналоги, гомологи, ортологи, варианты и производные.

Как указано, авторы настоящего изобретения установили, что R2R^{1/2} гены (и их белковые продукты) участвуют в событиях легочного и сердечного морфогенеза (таком как передача клеточных сигналов/развитие клетки), и поддерживают развитие трехмерной архитектуры легких и сердца.

Таким образом, первый аспект настоящего изобретения обеспечивает применение полинуклеотида, содержащего регенеративный ген для респираторных клеток R2R1 или R2R2 (R2R^{1/2}) либо оба, гена для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний и
- (c) рака;

где гены R2R имеют последовательности, идентичные по меньшей мере на 70% последовательностям, выбранным из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11.

Во втором аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение белка, кодируемого геном R2R^{1/2}, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний и
- (c) рака;

где белок, кодируемый геном R2R, имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 6, 9 и 12.

В третьем аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение антисмыслового олигонуклеотида, способного модулировать экспрессию гена R2R^{1/2}, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний; и
- (c) рака,

где ген R2R имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11.

В четвертом аспекте настоящее изобретение обеспечивает антителио или его антиген-связывающий фрагмент, способные к связыванию с белком, кодируемым геном R2R^{1/2}, имеющим последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 6, 9 и 12, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний; и
- (c) рака.

В пятом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний;
- (c) рака; и
- (d) предрасположенности к любому из (a)-(c);

где указанный способ включает этап выявления уровня экспрессии гена R2R^{1/2} в образце, полученном от исследуемого субъекта, причем выявление aberrантного уровня гена R2R в образце является показателем одного или нескольких указанных выше заболеваний и/или состояний и/или предрасположенности к ним, где ген R2R имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11, где aberrантным уровнем является уровень, повышенный или сниженный по сравнению с уровнем экспрессии в образце, полученном от субъекта, не страдающего указанными выше заболеваниями и/или состояниями.

Причем выявление уровня экспрессии гена R2R^{1/2} включает гибридизацию в жестких условиях олигонуклеотидного зонда и/или праймера со всей или частью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11.

В седьмом аспекте изобретение обеспечивает способ тестирования соединения на способность модулировать экспрессию гена R2R^{1/2}, включающий обеспечение контакта гена R2R с тестируемым соединением и детекцию модуляции экспрессии гена R2R, имеющего последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70%, причем детекция модуляции заключается в определении того, является ли уровень экспрессии гена R2R таким же, меньшим или большим, чем уровень экспрессии, детектированный в отсутствие тестируемого соединения, и если уровень меньше или больше, то тестируемое соединение может быть пригодно в качестве модулятора экспрессии гена R2R, а также пригодно для лечения заболеваний и/или состояний, указанных в пункте 1.

В восьмом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую ген R2R, имеющий последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70% последова-

тельности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11, а также фармацевтически пригодный наполнитель, носитель или разбавитель, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, указанных в п.1.

В девятом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую белок, кодируемый геном R2R и имеющий последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 6, 9 и 12, или, а также фармацевтически пригодный наполнитель, носитель или разбавитель, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, указанных в пункте 1.

В десятом аспекте настоящее изобретение обеспечивает животную модель для исследования сердечного и/или легочного заболевания или состояния, или рака, где животную модель получают путем модуляции или нарушения гена R2R, который имеет последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11.

При этом в отдельных частных случаях R2R^{1/2} гены и/или R2R^{1/2} белки применяют в лечении заболеваний и/или состояний, влияющих на развитие/структуру, дифференцировку, пролиферацию и/или морфогенез клеток/тканей сердца, например, влияющих на развитие и/или формирование межжелудочковой перегородки, или в производстве медикамента для лечения таких заболеваний и/или состояний.

В других частных случаях R2R¹ ген и/или белок применяют в лечении онкологического заболевания, например, поражающих различные ткани, включая, например, легочную и/или сердечную ткань, или, поскольку R2R^{1/2} гены и/или R2R^{1/2} белки можно применять в модуляции событий клеточного перехода, например, таких как события мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП) и события в обратном процессе эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), в лечении любого онкологического заболевания, связанного с aberrантными/дефективными процессам МЭП/ЭМП. Примеры некоторых онкологических заболеваний, которые можно лечить с применением генов и/или белков в соответствии с настоящим изобретением, подробно описаны ниже.

Термины "легочное заболевание" или "легочное состояние" могут включать патологии легких, такие как те, что влияют на развитие легких или трехмерную архитектуру легочных тканей. Например, "легочные заболевания" могут включать заболевания и/или состояния, влияющие на эпителиальные клетки, выстилающие воздухоносные пути легкого, эндотелиальные клетки легочной сосудистой сети, и/или на дифференцировку и/или рост этих клеток. Как таковые, легочные заболевания могут включать заболевания, влияющие на пути и события легочного морфогенеза. Легочные заболевания и/или состояния, влияющие на дифференцировку некоторых типов клеток легких (например, клетки плоского эпителия) или на создание и/или поддержание популяций клеток-предшественников (базальных), также можно лечить соединениями, медикаментами и способами, описанными здесь. В качестве специфического примера, такие заболевания, как бронхо-легочная дисплазия (БЛД) и/или хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), можно лечить с применением соединений, описанных здесь. В других вариантах осуществления, термин "легочное заболевание" или "легочное состояние" может включать расстройства клеточной пролиферации или неопластические расстройства, такие как рак, включая, например немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) и/или мелкоклеточный рак легкого (МРЛ).

Термин "сердечное заболевание" или "сердечное состояние" может включать такие патологии сердца, которые влияют на развитие сердца или трехмерную архитектуру сердечных тканей. Сердечные заболевания могут включать заболевания, влияющие на пути и события морфогенеза сердца, в частности, мезенхимально-эпителиальный и эпителиально-мезенхимальный переход. В качестве специфического примера, такие заболевания, как дефекты межпредсердной и межжелудочковой перегородки, дефекты атриовентрикулярного канала, деформации сердечных (атриовентрикулярных) клапанов и коронарных артерий, можно лечить с применением соединений, описанных здесь.

Также необходимо понять, что поскольку описанные здесь R2R^{1/2} гены/белки как было показано играют роль в процессах морфогенеза (таких как передача сигналов клетками, и т.д.) и поддержки развития трехмерной структуры сложных тканей, таких как легкие и/или сердце, они также могут найти применение в регенеративной медицине. В качестве примера, когда стволовые клетки (например, взрослые, эмбриональные или перепрограммированные соматические клетки (такие как iPS клетки)) применяются для восстановления или реконструкции, например, поврежденной или больной ткани, белки и/или гены, обеспеченные настоящим изобретением, можно применять для облегчения развития ткани.

R2R^{1/2} белок и гены играют важную роль в событиях морфогенеза в легких и сердце, в качестве регуляторов эпителиально-мезенхимального и мезенхимально-эпителиального перехода. Таким образом, они могут найти приложение в онкобиологии и лечении онкологических заболеваний. В качестве примера, такие заболевания, как трансформация локализованного рака в метастазы рака, можно лечить с применением соединений, описанных здесь.

Там, где сердечное или легочное заболевание или состояние возникает в результате, или связано с отсутствием или дефектом экспрессии/функции R2R^{1/2} гена и/или белка, применение R2R^{1/2} гена и/или белка, как описано выше, может обеспечить средства восстановления функции нормального (или дикого типа) R2R^{1/2} гена/ белка так, чтобы лечить и/или облегчать симптомы заболевания или состояния.

Необходимо понять, что применения, медикаменты и способы лечения, описанные здесь, могут

требовать создания рекомбинантных R2R^{1/2} генов/белков, и таким образом, настоящее изобретение дополнительно подразумевает способы создания и/или экспрессии рекомбинантных R2R^{1/2} генов и/или белков. Специалисту в данной области техники понятно, что ПЦР методики можно применять для избирательного получения R2R^{1/2} генов последовательностей из различных источников, включая, например, легочную ткань. Эти последовательности могут быть связаны с различными последовательностями контроля экспрессии или регуляции, например, такими как промоторные, операторные, индукторные, энхансерные и/или сайленсерные элементы, участки связывания с рибосомой и/или терминирующие последовательности. Подходящие регуляторные последовательности или последовательности контроля экспрессии могут быть выбраны специалистами в данной области техники для любого имеющегося хозяина. В другом варианте осуществления генные последовательности R2R^{1/2}, полученные с помощью ПЦР, можно ввести в вектор (такой как плазида или кассета экспрессии). В одном варианте осуществления вектор может дополнительно включать нуклеотидную последовательность с маркером или меткой для облегчения процедур очистки белка.

Клетка-хозяин может быть трансформирована вектором, и поддерживаться в условиях, пригодных для индукции экспрессии генной последовательности R2R^{1/2} и продукции рекомбинантного R2R^{1/2}. Векторы, в которых клонируют генные последовательности R2R^{1/2} (или их фрагменты), можно ввести или трансфицировать в клетки с применением различных методик - такие методики могут быть иначе обозначены как процедура трансфекции. В процедуре трансфекции применяются условия, которые делают клеточные мембраны проницаемыми для таких соединений, как нуклеиновые кислоты. В качестве примера, можно облегчить трансфекцию векторов, включая векторы экспрессии, в клетки с применением электропорации, теплового шока, химических соединений, например, таких как фосфат кальция, фосфат стронция, методики микроинъекции и/или генные пушки.

Методики, используемые для очистки рекомбинантных белков, полученных данным способом, известны, если рекомбинантный белок мечен или маркирован, они могут включать применение, например, методик аффинной хроматографии.

В свете вышеизложенного, четвертый и пятый аспекты настоящего изобретения обеспечивают экспрессирующийся вектор, содержащий генную последовательность R2R^{1/2}, и клетку-хозяина, трансформированную им, соответственно.

В дополнение к обеспечению R2R^{1/2} генов и/или белков как средства лечения различных заболеваний и/или состояний (например, сердечных и/или легочных заболеваний и/или состояний), настоящее изобретение также обеспечивает соединения, способные модулировать экспрессию R2R^{1/2} генов, которые можно применять в лечении состояний, возникающих в результате, или связанных с избыточной экспрессией R2R^{1/2} гена/белка. Такие соединения могут быть олигонуклеотидами, предпочтительно, антисмысловыми олигонуклеотидами, которые могут принимать форму, например, ДНК и/или РНК. В другом варианте осуществления олигонуклеотиды являются молекулами РНК, известным специалистам в данной области техники как малая/короткая интерферирующая РНК и/или РНК сайленсинга, которая далее обозначается как миРНК. Такие миРНК олигонуклеотиды могут принимать форму нативных РНК дуплексов, или дуплексов некоторым образом модифицированных (например, посредством химической модификации) для придания устойчивости к нуклеазе. В дополнение или альтернативно, миРНК олигонуклеотиды могут принимать форму малой шпилечной РНК (мшРНК), экспрессирующихся или плазмидных конструкций, которые соответствуют или содержат миРНК, описанные здесь.

Олигонуклеотиды, обеспеченные настоящим изобретением, могут быть предназначены для модуляции экспрессии R2R^{1/2} генов. При анализе R2R^{1/2} последовательностей нативного или дикого типа с помощью алгоритмов, таких как BIOPREDsi, специалист в данной области техники сможет легко определить или спрогнозировать с помощью компьютера нуклеиново-кислотную последовательность, обладающую оптимальным эффектом нокдауна этих генов (см., например, <http://www.biopredsi.org/start.html>). Соответственно, специалист в данной области техники может создать и проанализировать массив или библиотеку различных нуклеотидов для определения того, способны ли они модулировать экспрессию R2R^{1/2} генов.

В свете вышеизложенного, антисмысловые нуклеотиды и/или миРНК молекулы, описанные здесь, можно применять (i) для лечения любых заболеваний и/или состояний, описанных здесь, в частности (ii) для лечения легочных заболеваний и/или состояний, (iii) для лечения сердечных заболеваний и/или состояний и (iv) для лечения рака. Далее, антисмысловые нуклеотиды и/или миРНК молекулы, описанные здесь, можно применять в производстве медикаментов для лечения заболеваний, указанных в пунктах (i)-(iv) выше, или в способах лечения субъектов, страдающих такими заболеваниями или расстройствами.

Кроме того, антитела (или их антиген-связывающие фрагменты), способные связывать R2R^{1/2} белки, можно применять в лечении заболеваний и/или состояний, описанных здесь, включая, например, сердечные и/или легочные заболевания и/или состояния. Антитела, которые блокируют или нейтрализуют функцию R2R^{1/2} белков, могут быть особо пригодными, если заболевание и/или состояние возникает в результате избыточной экспрессии R2R^{1/2} белка. Методики, используемые для создания моноклональных антител (мАТ), хорошо известны, и легко могут применяться для создания мАТ, специфичных для R2R¹ и/или R2R² белков или их фрагментов. Подобным образом, способы, используемые для создания поли-

клональных антител, также хорошо известны, и могут применяться для создания антител, специфичных для R2R¹ и/или R2R² белков или их фрагментов.

Другие соединения, пригодные в лечении заболеваний и/или состояний, описанных здесь (например, сердечных и/или легочных состояний и/или заболеваний, или рака), могут включать, например, белки, пептиды, аминокислоты, углеводы и другие малые органические молекулы.

В дополнение к вышеизложенному, изолированные нуклеотидные и/или белковые последовательности R2R^{1/2} можно применять в качестве основы для конструкции зондов и/или праймеров для применения в исследованиях по детекции и экспрессии *ex vivo* и/или *in situ*. Типичные исследования по детекции включают, например, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), гибридизационные исследования, процедуры секвенирования и методики иммунологической детекции и саузерн-нозерн блоттинга.

В принципе, любой полинуклеотидный (или олигонуклеотидный) или полипептидный фрагмент, сконструированный из последовательностей, описанных выше, можно применять в указанных исследованиях по детекции и/или экспрессии.

Как правило, полинуклеотидные фрагменты для применения в качестве зондов и/или праймеров, включают 10-30 нуклеотидов (хотя в некоторых приложениях можно применять другую длину), и проявляют определенную степень специфичности к конкретной последовательности, и не связываются с неродственными последовательностями. Подобным образом, полипептидные фрагменты для применения в качестве зондов могут также быть относительно короткими, и как правило могут содержать 5-20 аминокислот (хотя в некоторых приложениях может применяться другая слегка более короткая или продолжительная длина).

Легко понять, что тщательный выбор последовательности праймера/зонда и применение жестких (предпочтительно очень жестких) условий гибридизации сведет к минимуму любое неизбежное связывание.

Соответственно, олигонуклеотидные последовательности зонда и/или праймера, имеющие по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95% комплементарность, а также те, которые имеют полную (т.е. 100%) комплементарность ко всем частям нуклеотидных последовательностей, описанных здесь, находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Гибридизацию между зондом/праймером и нуклеиново-кислотной последовательностью (такой как любые, описанные здесь), можно проводить при температуре около 40°C-75°C в 2-6 × SSC буферном растворе (т.е. растворе 2-6 × NaCl 17,5 г/л и цитрата натрия (SC) 8,8 г/л), содержащем 0,1% додецилсульфат натрия (ДСН). Конечно, в зависимости от степени сходства между зондом/праймером и последовательностью, можно применять буферные растворы с уменьшенной концентрацией SSC (т.е. 1 × SSC, содержащий 0,1% ДСН; 0,5 × SSC, содержащий 0,1% ДСН; и 0,1 × SSC, содержащий 0,1% ДСН).

Полипептидные зонды, обладающие по меньшей мере 30, 50, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичностью, а также обладающие полной (т.е. 100%) идентичностью ко всей или к части последовательности, раскрытой здесь, входят в объем настоящего изобретения.

Как таковой, дополнительный аспект настоящего изобретения обеспечивает олигонуклеотидные зонды и/или праймеры, предназначенные для гибридизации всей или части последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и/или 11. Кроме того, другой аспект обеспечивает полипептидные зонды, сконструированные для связывания со всей или с частью последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 6, 9 и 12.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ диагностики легочного заболевания или состояния, и/или восприимчивости к нему, где способ включает определение того, отмечается ли aberrантная экспрессия генов R2R¹ и/или R2R² у субъекта.

У субъектов с диагнозом, например, рака и/или сердечного и/или легочного заболевания может проявляться aberrантная (т.е. повышенная или сниженная) экспрессия гена/белка R2R¹ и/или R2R². Термин "aberrантная экспрессия" нужно понимать, как охватывающий уровень экспрессии гена как повышенный и/или сниженный, по сравнению с образцом, полученным у здорового субъекта или субъекта, не страдающего заболеванием и/или состоянием (а именно, сердечным или легочным заболеванием и/или состоянием или раком).

Термин "образец" необходимо понимать как включающий образцы жидкостей организма, такие как цельная кровь, плазма, сыворотка, слюна, пот и/или сперма. В других случаях могут применяться такие "образцы", как биоптаты и/или соскобы тканей. В частности, можно применять биоптаты и/или соскобы легочной ткани. Кроме того, образец может содержать ткань или секрет железы, и могут применяться процедуры промывания для получения образца жидкости, секретируемой, например, в легком. Подходящие процедуры промывания могут включать процедуру бронхо-альвеолярного лаважа. Специалисту в данной области техники понятно, что образцы, описанные выше, могут обеспечивать большие количества нуклеиновой кислоты R2R^{1/2} (т.е. ДНК или РНК) и/или R2R^{1/2} белков, пептидов (или их фрагментов). Далее, эти способы могут содержать первый этап обеспечения образца от субъекта, предположительно страдающего легочным заболеванием и/или состоянием, или подверженного риску развития легочного заболевания и/или состояния.

Повышение уровня экспрессии гена/белка R2R¹ и/или R2R² может быть связано с любым из заболеваний и/или состояний, описанных выше, или восприимчивостью к ним. Например, повышение экспрессии R2R^{1/2} гена/белка может указывать на избыточную клеточную пролиферацию и/или дифференцировку, и может быть связано, например, с неопластическим состоянием, таким как рак (т.е. рак легких). Снижение экспрессии гена/белка R2R¹ и/или R2R² может указывать на патологические состояния, характеризующиеся плохим или нарушенным развитием сердца/легкого. Такие условия могут приводить к повреждению тканей (из-за механического стресса в сердце/легких), рубцеванию, потере структурной целостности сердца/легких, и деформации или повреждению структуры воздухоносных путей легких или сердца.

Специалисту в данной области техники известны методики, которые можно применять для идентификации уровней белков и/или генов, таких как R2R^{1/2} гены и/или белки, в таких образцах, как перечислено выше.

Такие методики могут включать, например, методики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), такие как ПЦР в режиме реального времени (иначе известная как количественная ПЦР). В данном случае, ПЦР в режиме реального времени можно применять для определения уровня экспрессии генов, кодирующих R2R¹ и/или R2R² белки. Как правило, для количественного определения уровня экспрессии конкретной нуклеиново-кислотной последовательности, можно применять ПЦР с обратной транскриптазой для обратного транскрибирования соответствующей мРНК в комплементарную ДНК (кДНК). Предпочтительно, в процедуре обратной транскрипции можно применять праймеры, предназначенные для специфической амплификации последовательности интересующей мРНК. Далее, ПЦР можно применять для амплификации кДНК, образуемой при обратной транскрипции.

Как правило, кДНК амплифицируют с применением праймеров, предназначенных для специфической гибридизации с определенной последовательностью, а нуклеотиды, используемые для ПЦР, могут быть помечены флюоресцентными или радиоактивными соединениями.

Специалисту в данной области техники известны методики применения меченых нуклеотидов для количественного определения ДНК, полученной во время ПЦР. Вкратце, и в качестве примера, количество меченой амплифицированной нуклеиновой кислоты можно определить путем мониторинга количества включенного меченого нуклеотида во время циклов ПЦР.

Дополнительную информацию, касающуюся методик на основе ПЦР, описанных здесь, можно найти, например, в "PCR Primer: A Laboratory Manual, Second Edition Edited by Carl W. Dieffenbach & Gabriela S. Dveksler: Cold Spring Harbour Laboratory Press" ("ПЦР праймер: Лабораторное руководство") и "Molecular Cloning: A Laboratory Manual by Joseph Sambrook & David Russell: Cold Spring Harbour Laboratory Press" ("Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство").

Другие методики, которые можно применять для определения уровня экспрессии гена R2R¹ и/или R2R² в образце, включают, например, методики нозерн-блоттинга и/или саузерн-блоттинга. Нозерн-блоттинг можно применять для определения количества конкретной ДНК, присутствующей в образце, и таким образом, можно использовать для определения количества экспрессии R2R¹ и/или R2R² гена. Вкратце, мРНК можно экстрагировать, например, из основанной на клетках или бесклеточной системы, модифицированной для включения экспрессируемых R2R¹ и/или R2R² генов, с применением методик, известных специалистам в данной области техники, и подвергнуть электрофорезу. Нуклеиновокислотный зонд, предназначенный для гибридизации (т.е. комплементарный) интересующей последовательности мРНК, в данном случае мРНК, кодирующей R2R¹ и/или R2R² белки, можно применять для детекции и количественного определения конкретной мРНК, присутствующей в образце.

В дополнение или альтернативно, уровень экспрессии R2R¹ и/или R2R² гена можно выявить с помощью микроматричного анализа. Такой способ включает применение ДНК микроматрицы, содержащей нуклеиновую кислоту, полученную из R2R¹ и/или R2R² генов. Для идентификации уровня экспрессии R2R¹ и/или R2R² генов, специалист в данной области техники может экстрагировать нуклеиновую кислоту, предпочтительно мРНК из системы (основанной на клетках или бесклеточной), подвергнутой способу, описанному в первом аспекте настоящего изобретения, и подвергнуть её процедуре амплификации, такому как ПЦР с обратной транскриптазой, для создания кДНК. Предпочтительно, можно применять праймеры, специфичные для определенной последовательности мРНК, в данном случае последовательности, кодирующие R2R¹ и/или R2R² гены.

Амплифицированную R2R¹ и/или R2R² кДНК можно подвергать этапу дополнительной амплификации, необязательно в присутствии меченых нуклеотидов (как описано выше). Затем можно контактировать амплифицированную кДНК, которая необязательно помечена, с микроматрицей в условиях, обеспечивающих ее связывание с ДНК микроматрицы. Таким образом, можно идентифицировать уровень экспрессии R2R¹ и/или R2R² генов.

Дополнительную информацию, касающуюся вышеописанных методик, можно найти, например, в "PCR Primer: A Laboratory Manual, Second Edition Edited by Carl W. Dieffenbach & Gabriela S. Dveksler: Cold Spring Harbour Laboratory Press" ("ПЦР праймер: Лабораторное руководство") и "Molecular Cloning: A Laboratory Manual by Joseph Sambrook & David Russell: Cold Spring Harbour Laboratory Press" ("Молекулярное клонирование: Лабораторное руководство").

Для определения уровня $R2R^{1/2}$ белков в образце можно применять иммунологические методики с применением агентов, способных связывать $R2R^{1/2}$ белки.

В одном варианте осуществления диагностические способы, описанные выше, могут включать этап контакта субстрата (или его части) с исследуемым образцом, в условиях, обеспечивающих ассоциацию, взаимодействие, связывание и/или иммобилизацию любого $R2R^{1/2}$ белка, присутствующего в образце, с указанным субстратом.

Подходящие субстраты могут включать, например, стекло, нитроцеллюлозу, бумагу, агарозу, и/или пластики. Такой субстрат, например, пластиковый материал, может иметь форму планшета для микротитрования.

Альтернативно, субстрат для контакта с исследуемым образцом может содержать агент, способный связываться с $R2R^{1/2}$ белком(ами). Предпочтительно, агент, способный связываться с $R2R^{1/2}$ белками, сам связан с субстратом (или по меньшей мере с его частью). Подходящие связывающие агенты могут включать, например, антитела, такие как моноклональные или поликлональные антитела, и/или другие типы пептидов или малых молекул, способных связываться с $R2R^{1/2}$ белками. Необходимо понять, что это определение применяется ко всем типам связывающих агентов, упоминаемых здесь. Таким образом, субстрат (или его часть) может контактировать с анализируемым образцом в условиях, обеспечивающих связывание или взаимодействие между агентами, способными связывать $R2R^{1/2}$ белок, и любым $R2R^{1/2}$ белком, присутствующим в образце.

Любой $R2R^{1/2}$ белок, связанный с субстратом или агентами, способными к связыванию $R2R^{1/2}$ белка(ов), можно определить с применением дополнительного агента, способного связываться с $R2R^{1/2}$ белком(ами) (далее обозначаемого как "первичный связывающий агент"). В дополнение или альтернативно, первичные связывающие агенты могут обладать аффинностью к, или связываться с комплексами $R2R^1/R2R^2$ белок: субстрат или комплексами, содержащими $R2R^{1/2}$ белки и вышеупомянутые агенты, способные связываться с $R2R^{1/2}$ белками.

Первичные связывающие агенты могут быть конъюгированы с компонентами, обеспечивающими их детекцию (далее обозначаемыми как "детектируемые компоненты"). Например, первичные связывающие агенты могут быть конъюгированы с ферментом, уровень которого можно определить с помощью колориметрической хемилюминесцентной реакции. Такие конъюгированные ферменты могут включать пероксидазу хрена (ПХ) и щелочную фосфатазу (ЩФ), но не ограничиваются ими. В дополнение или альтернативно, первичные связывающие агенты могут быть конъюгированы с флуоресцентной молекулой, например, флуорофором, таким как ФИТЦ, родамин, или краситель техасский красный. Другие типы молекул, которые могут быть конъюгированы со связывающими агентами, включают меченые радиоактивно компоненты.

Альтернативно, любой $R2R^{1/2}$ белок, связанный с субстратом или агентами, способными связываться с $R2R^{1/2}$ белками, можно определить посредством еще одного связывающего агента (далее обозначаемого как "вторичный связывающий агент"), обладающего аффинностью к первичным связывающим агентам. Предпочтительно, вторичные связывающие агенты конъюгированы с детектируемыми компонентами.

Количество первичного связывающего агента (или вторичного связывающего агента, соединенного с ним), связанного с $R2R^{1/2}$ белком(ами), может отражать уровень $R2R^{1/2}$ белка(ов), присутствующего в исследуемом образце.

В одном варианте осуществления способы идентификации уровня $R2R^{1/2}$ белка могут иметь форму анализа с тест-полоской, где субстрат (или его часть) приводят в контакт с исследуемым образцом в условиях, обеспечивающих связывание какого-либо $R2R^{1/2}$ белка(ов), присутствующего в образце, с субстратом или связывающим агентом, присоединенным или иммобилизованным на нем.

В другом варианте осуществления способы могут иметь форму иммунологического анализа, например, такого как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). ELISA может иметь форму ELISA "с захватом", в котором анализируемый образец приводят в контакт с субстратом, и любой $R2R^{1/2}$ белок(и), присутствующий в образце, захватывается или связывается связывающим агентом (способным к связыванию с $R2R^{1/2}$ белками), связанным или иммобилизованным на субстрате. Альтернативно, образец может контактировать с субстратом в условиях, обеспечивающих "прямое" связывание между любым $R2R^{1/2}$ белком(ами), присутствующим в образце, и субстратом.

Каждый из способов ELISA, описанных выше, может включать этап "прямого" выявления $R2R^{1/2}$ белка, или этап "непрямой" идентификации. ELISA, включающий такие этапы, можно обозначить как "прямой" ELISA или "непрямой" ELISA.

"Прямой" ELISA может включать обеспечение контакта исследуемого образца с субстратом в условиях, обеспечивающих связывание любого $R2R^{1/2}$ белка, присутствующего в образце, с субстратом и/или связывающим агентом, соединенным с ним. После необязательного этапа блокирования, связанный $R2R^{1/2}$ белок(и) можно выявить с помощью агента, способного связываться с $R2R^{1/2}$ белками (т.е. первичного связывающего агента). Предпочтительно, первичные связывающие агенты конъюгированы с детектируемым компонентом.

"Непрямой" ELISA может включать дополнительный этап, после контакта с $R2R^{1/2}$ белка(ов) с первичным связывающим агентом, с применением дополнительного связывающего агента (вторичного связывающего агента).

шего агента), обладающего аффинностью или специфичностью в отношении первичного связывающего агента. Предпочтительно, вторичный связывающий агент может быть конъюгирован с детектируемым компонентом.

Другие иммунологические методики, которые можно применять для идентификации уровня $R2R^{1/2}$ белка в образце, включают, например, иммуногистохимический анализ, при котором связывающие агенты, такие как антитела, способные связывать $R2R^{1/2}$ белок(и), приводят в контакт с образцом, предпочтительно, образцом ткани, в условиях, обеспечивающих связывание между любым $R2R^{1/2}$ белком(ами), присутствующим в образце, и агентом, связывающим $R2R^{1/2}$ белок. Как правило, перед контактом образца со связывающим агентом, образец обрабатывают, например, детергентом, таким как Тритон X100. Такая методика может обозначаться как "прямое" иммуногистохимическое окрашивание.

Альтернативно, анализируемый образец можно подвергать процедуре непрямого иммуногистохимического окрашивания, в котором после контакта образца с агентом, связывающим $R2R^{1/2}$ белок, применяют дополнительный связывающий агент (вторичный связывающий агент), который специфичен, обладает аффинностью, или способен связываться с агентом, связывающим $R2R^{1/2}$ белок, для выявления комплексов $R2R^{1/2}$ белок/связывающий агент.

Специалисту в данной области техники понятно, что в прямых и непрямых иммуногистохимических методиках связывающий агент может быть конъюгирован с детектируемым компонентом. Предпочтительно, связывающий компонент или вторичный связывающий агент конъюгирован с компонентом, способным обеспечить определение уровня присоединенного связывающего агента или вторичного связывающего агента, с помощью колориметрической хемилюминесцентной реакции.

Для идентификации уровней $R2R^{1/2}$ белка(ов), присутствующих в образце, можно сравнить результаты иммуногистохимического окрашивания с результатами иммуногистохимического окрашивания эталонного образца. В качестве примера, образец, содержащий больше или меньше агента, связывающего $R2R^{1/2}$ белок (или вторичного связывающего агента), чем в эталонном образце, может быть получен у субъекта с конкретным заболеванием и/или состоянием.

Другие методики, включающие применение агентов, способных связывать $R2R^{1/2}$ белки, включают, например, такие методики, как вестерн-блоттинг или дот-блот. Вестерн-блоттинг может включать электрофорез образца для разделения или разложения на составляющие компоненты образца, например, белковых компонентов. Разделенные компоненты можно затем перенести на субстрат, такой как нитроцеллюлоза. Для идентификации какого-либо $R2R^{1/2}$ белка(ов), присутствующих в образце, можно обеспечить контакт субстрата со связывающим агентом, способным связывать $R2R^{1/2}$ белок(и) в условиях, обеспечивающих связывание между любым $R2R^{1/2}$ белком(ами), присутствующим в образце, и агентами, способными связывать $R2R^{1/2}$ белок(и).

Предпочтительно, агент, способный связывать $R2R^{1/2}$ белок(и), может быть конъюгированным с детектируемым компонентом.

Альтернативно, субстрат может контактировать с другим связывающим агентом, обладающим аффинностью к связывающему агенту(ам), способному связывать $R2R^{1/2}$ белок(и). Предпочтительно, дополнительный связывающий агент может быть конъюгирован с детектируемым компонентом.

В случае дот-блота можно обеспечить контакт образца или его части с субстратом, так чтобы любой $R2R^{1/2}$ белок(и), присутствующий в образце, связывался с субстратом или иммобилизовался на субстрате. Идентификацию связанного или иммобилизованного $R2R^{1/2}$ белка(ов) можно проводить, как описано выше.

В любой из вышеупомянутых методик количество обнаруживаемого первичного или вторичного связывающего агента представляет или является пропорциональным количеству $R2R^{1/2}$ белка, присутствующего в образце. Далее, результаты, полученные в любом или во всех диагностических способах, описанных выше, можно сравнить с результатами, полученными для эталонного или контрольного образцов, полученных у здоровых субъектов, которые, как известно, не страдают и не подвержены развитию конкретного заболевания или расстройства (например, такого как сердечное и/или легочное заболевание или расстройство, и/или рак).

Дополнительный аспект настоящего изобретения включает способ идентификации или получения агентов, модулирующих экспрессию $R2R^1$ и/или $R2R^2$ генов, включающий этапы контакта $R2R^1$ и/или $R2R^2$ генов с агентом тестирования, и выявление модуляции экспрессии $R2R^{1/2}$ гена.

Специалисту в данной области техники понятно, что такой способ, как описан в 9-м аспекте настоящего изобретения, может быть проведен в таких системах, как например, системы на основе клеток или бесклеточных системах, модифицированные для включения $R2R^1$ и/или $R2R^2$ генов. В качестве примера, клетки можно трансфицировать нуклеиновой кислотой, содержащей $R2R^1$ или $R2R^2$ ген. В одном варианте осуществления нуклеиновую кислоту можно взять в форме вектора (например, плазмиды или кассеты экспрессии, как описано выше).

В одном варианте осуществления результаты, полученные из способов, описанных выше, можно сравнить с результатами, полученными от контрольного способа, в котором $R2R^1$ и/или $R2R^2$ гены не контактировали с исследуемым агентом. Таким образом, можно определить, способен ли указанный агент модулировать экспрессию $R2R^1$ и/или $R2R^2$ генов. Если уровень экспрессии $R2R^1$ и/или $R2R^2$ генов

меньше или больше уровня экспрессии, выявленного в контрольном способе, исследуемый агент может быть пригоден в качестве модулятора экспрессии R2R¹ и/или R2R² генов. Если уровень экспрессии является таким же, как в контрольных способах, исследуемый агент, вероятно, не способен модулировать экспрессию R2R¹ и/или R2R² генов.

Подходящие исследуемые агенты могут иметь форму нуклеиновых кислот, например, антисмысловых нуклеотидов, описанных выше, белков, пептидов, аминокислот, антител (и их фрагментов), углеводов и других малых органических молекул.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие R2R^{1/2} гены/белки, описанные выше, антисмысловые олигонуклеотиды (ДНК или РНК), как описано выше, и/или любые агенты, обеспеченные в способах, обеспеченных в 9-м аспекте настоящего изобретения, способные модулировать экспрессию или функцию R2R¹ и/или R2R² генов/белков, в ассоциации с фармакологически приемлемым наполнителем, носителем или разбавителем. Такие композиции могут найти применение, например, в лечении различных заболеваний и/или состояний, описанных здесь, включая сердечные и/или легочные заболевания и/или рак, как описано выше.

Предпочтительно, фармацевтические композиции, обеспеченные настоящим изобретением, являются стерильными фармацевтическими композициями. Подходящие наполнители, носители или разбавители могут включать, например, воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстрозу, глицерин, этанол, ионообменники, окись алюминия, стеарат алюминия, лецитин; сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин; буферные вещества, такие как фосфаты; глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, частичные глицеридные смеси насыщенных жирных кислот растительного происхождения, водные соли или электролиты, такие как протаминасульфат, динатрия гидрофосфат, калия гидрофосфат, натрия хлорид, соли цинка, коллоидный кварц, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натрия карбоксиметлцеллюлозу, полиакрилаты, воски, и ланолин и тому подобное, или их комбинации.

Указанная фармацевтическая рецептура может быть в форме, например, пригодной для перорального, парентерального или местного применения. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция может быть в форме, предназначенной для ингаляции. Композиции, предназначенные для применения путем ингаляции, могут быть в форме мелких порошков или растворов, которые можно применять в виде аэрозоля, или вдыхать в виде капелек. Специалисту в данной области техники известны устройства, которые можно применять для доставки композиций непосредственно в легкие, например, посредством ингаляции. Размер капелек конкретной композиции можно изменить так, чтобы лекарство было доступно для различных участков легких. Например, при ингаляции малые частицы или капельки могут глубоко проникать в легочную ткань, и в некоторых случаях могут достигать альвеол.

Фармацевтические композиции для местного применения могут быть представлены в форме мази, раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде эмульсии масло-в-воде.

Соединения, способные модулировать R2R¹ и/или R2R² гены, например, такие как гены, выявленные с помощью способов, описанных здесь, или фрагменты R2R^{1/2} генов/белков, антисмысловые олигонуклеотиды и антитела, описанные здесь, могут найти дополнительное применение в качестве модуляторов клеточной дифференцировки. Как указано, авторы изобретения определили, что R2R¹ и R2R² гены и их продукты вовлечены в пути модуляции дифференцировки эпителиальных клеток легких, в частности клеток плоского эпителия, образуемых из популяции клеток-предшественников легочного эпителия или базальных клеток (т.е. Krt14^{+ve} клеток).

Соединения, модулирующие дифференцировку клеток (например, эпителиальных клеток легких), могут быть особо пригодными для лечения таких заболеваний, как БЛД, приводящих к повреждению и рубцеванию легких со сниженным или недоразвитым регенеративным потенциалом. Таким образом, при применении или использовании соединения, модулирующего дифференцировку клеток, можно улучшить или восстановить регенеративный потенциал легкого. Специалисту в данной области техники понятно, что соединения, способные усилить или стимулировать экспрессию R2R¹ и/или R2R² генов, или восстановить функцию этих генов, могут быть особо полезными.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает животную модель для изучения процессов развития ткани и/или клеточного перехода, а также некоторых заболеваний и/или состояний (включая сердечные и/или легочные заболевания и/или состояния, и рак). В одном варианте осуществления животная модель может быть создана путем манипуляции или модуляции (т.е. повышающей или понижающей регуляции) экспрессии R2R^{1/2} генов/белков. В дополнение или альтернативно, животная модель может быть создана путем нарушения экспрессии R2R^{1/2} генов/белков. Как описано выше, открытие ряда последовательностей R2R^{1/2} генов/белков человека и мыши обеспечивает для специалиста в данной области техники возможность простой манипуляции этими последовательностями *in situ* для создания животных моделей. Например, можно создать "нокаутных" животных, т.е. снизить или по существу устранить экспрессию последовательности R2R^{1/2} генов. Такие модели пригодны для применения с целью тестирования эффектов лекарств, потенциально пригодных для лечения заболеваний и/или расстройств, описанных здесь, и/или для определения функции или роли конкретного гена. Альтернативно, можно также создать животные модели с повышающей регуляцией экспрессии R2R^{1/2} генов/белков. Таким об-

разом, можно анализировать эффективность и функцию лекарств, нацеленных на супрессию повышающей регуляции экспрессии R2R^{1/2} генов/белков. Также можно исследовать эффект повышающей регуляции экспрессии R2R^{1/2} генов/белков у этих животных.

В других вариантах осуществления замены, добавления, делеции и/или инверсии можно ввести в последовательности R2R^{1/2} генов для изменения активности белков и для выявления функции некоторых доменов, аминокислот и тому подобного. В дополнение или альтернативно, нокаутных животных, таких как те, что описаны выше, можно трансформировать с любой из последовательностей генов, описанных здесь. Это особенно полезно, если нужно изучать эффект вариантного или мутантного R2R^{1/2} гена, или эффективность лекарства или соединения, способного подавлять экспрессию или функцию указанной вариантной или мутантной последовательности.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предлагается применение полинуклеотида, содержащего регенеративный ген для респираторных клеток R2R1 или R2R2 (R2R1/2) для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний и
- (c) рака;

где ген R2R1/2 имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и/или 11, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70%.

Также предложено применение белка, кодируемого геном R2R1/2, антисмыслового олигонуклеотида, способного модулировать экспрессию гена R2R1/2, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний и
- (c) рака;

где белок, кодируемый геном R2R1/2, имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 6, 9 и 12, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70%.

Следующим объектом настоящего изобретения является антитело или его антиген-связывающий фрагмент, способные к связыванию с белком, кодируемым геном R2R1/2 и имеющим последовательность, выбранную из обозначенных SEQ ID NO: 3, 6, 9 и/или 12, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70%, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний и
- (c) рака.

Для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний и
- (c) рака может быть использована фармацевтическая композиция, включающая фармацевтически

пригодный наполнитель, носитель или разбавитель, а также либо ген R2R1/2, имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и/или 11, или последовательность, идентичную им по меньшей мере на 70%, либо белок, кодируемый геном R2R1/2 и имеющий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 6, 9 и/или 12, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70%.

Выявление уровня экспрессии гена R2R1/2 может быть полезно для диагностики сердечных, легочных заболеваний и/или состояний, рака и предрасположенности к указанным заболеваниям и состояниям.

Поэтому еще одним объектом настоящего изобретения является способ диагностики одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний;
- (c) рака;
- (d) предрасположенности к любому из (a)-(c);

где указанный способ включает этап выявления уровня экспрессии гена R2R1/2 в образце, полученном от исследуемого субъекта, причем выявление aberrантного уровня гена R2R1/2 в образце является показателем указанных одного или нескольких заболеваний и/или состояний и/или предрасположенности к ним, где ген R2R1/2 имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и/или 11, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70%, где aberrантным уровнем является уровень, повышенный и/или сниженный, по сравнению с уровнем экспрессии, обнаруженным в образце, полученном от субъекта, не страдающего заболеванием и/или состоянием.

Указанный способ может быть осуществлен с использованием олигонуклеотидного зонда и/или праймера, предназначенного для гибридизации в жестких условиях, со всей или с частью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и/или 11, где олигонуклеотидный зонд и/или пример используют для определения уровня экспрессии гена R2R1/2.

В соответствии с настоящим изобретением могут быть идентифицированы или получены агенты, которые модулируют экспрессию гена R2R1/2.

Поэтому следующим объектом настоящего изобретения является способ идентификации или получения агентов, которые модулируют экспрессию гена R2R1/2, включающий этапы обеспечения контакта гена R2R1/2 с тестируемым соединением, и детекции любого рода модуляции экспрессии гена R2R1/2, имеющего последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и/или 11, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70%, причем детекция любого рода модуляции заключается в определении того, является ли уровень экспрессии гена R2R1/2 таким же, меньшим или большим, чем уровень экспрессии, детектированный в отсутствие тестируемого соединения, и если уровень меньше или больше, то тестируемое соединение может быть пригодно в качестве модулятора экспрессии гена R2R1/2, причем такое протестированное соединение пригодно для лечения заболеваний и/или состояний, указанных в пункте 1.

Для исследования сердечного и/или легочного заболевания или состояния, или рака можно использовать животную модель, полученную путем модуляции или нарушения гена R2R1/2, который имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и/или 11, или последовательности, идентичной им по меньшей мере на 70%.

Поэтому еще одним объектом настоящего изобретения является животная модель для исследования сердечного и/или легочного заболевания или состояния, или рака, которую получают путем модуляции или нарушения гена R2R1/2, который имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и/или 11, или последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 70%.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение далее подробно описано со ссылкой на следующие фигуры.

Фиг. 1 - сравнение эндотелиальных и эпителиальных клеток из Vegf^{+/+} на E16.5 диаграмме разброса данных демонстрирует на вертикальной оси значение каждого гена при анализе эффекта клеточного происхождения (на основе LIMMA). По горизонтальной оси показано кратное изменение при сравнении 2 тканей. Ker⁺ клетки экспрессируют архитектурные эпителиальные гены, в то время как il⁺ клетки транскрибируют репрезентативные эндотелиальные гены. Эндотелиальный Cldn5 и эпителиальный Foxa1 выделены, поскольку они также присутствуют в качестве верхних генов по вертикальной оси (PC₂) неконтролируемого анализа спектральных карт (см. фиг. 3).

Фиг. 2 - схематическое представление процесса лазерной захватывающей микродиссекции. Грудные клетки эмбрионов (A) нарезают на секции по 8 мм и помещали на слайды (B). Двойное иммуногистохимическое окрашивание этих тканевых срезов (C) антителами к панкератину и GS-IB4 изолейцином разделяло клетки легочных воздухоносных путей с эпителиальной (D) дифференцировкой от окружающих клеток с эндотелиальными (E) характеристиками. Специфические группы клеток, выделенные с помощью лазерной захватывающей микродиссекции, показаны на F и G (L - легкое, H-сердце).

Фиг. 3 - анализ спектральной карты с первым основным компонентом (PC1 по X-оси) и вторым основным компонентом (PC2 по Y-оси). Влияние времени или возраста эмбрионов оценивали по PC1 (с учетом 35% вариации в наборе данных). Генетические зонды или гены, экспрессируемые позднее в эмбриональной жизни, такие как Sfrp, расположены дальше по X-оси. Различия в клеточном происхождении (клетки il⁺ против ker⁺) было установлено в PC2. Генетические зонды эпителиальных генов ('EPI') были расположены дальше по Y-оси, по сравнению с генетическими зондами семейств эндотелиальных генов ('ENDO'). Различные группы образцов разделяли на спектральной карте по PC1 (возрасту эмбрионов) и PC2 (клеточному происхождению). Ker⁺ образцы собраны на эпителиальной стороне Y-оси, а il⁺ образцы сгруппированы на эндотелиальной стороне. Образцы также распределены по X-оси в соответствии с возрастом эмбрионов. Образцы с более поздним возрастом располагаются дальше по X-оси. На панели ниже показаны 3 профиля экспрессии: (1) показывающий разницу между эпителиальными и эндотелиальными клетками по экспрессии Foxa1, (2) показывающий эффект возраста эмбриона в отношении экспрессии Afr и (3) показывающий профиль зависимости от генотипа и возраста эмбрионов для экспрессии Hnr.

Фиг. 4 - сравнение эпителиальных клеток генотипов Vegf^{+/+} и Vegf120/120. А. Диаграмма разброса данных показывает на Y-оси значение каждого гена для анализа различия профиля отличия в зависимости от возраста эмбриона между генотипами Vegf^{+/+} и Vegf120/120 (на основе LIMMA). По X-оси показана кратность изменения индукции при сравнении 2 генотипов, Vegf^{+/+} против Vegf120/120 при E16.5. Повышающая регуляция Krt6a, EDC и SCC генов в клетках дикого типа ker⁺ выделена. В. Эпителиальные клетки воздухоносных путей в E16.5 Vegf^{+/+} легких определены окрашиванием антителами к цитокератину 4, 5, 6, 8, 10, 13 и 18. Клетки дистальных воздухоносных путей имеют морфологию плоских клеток (желтая стрелка), в отличие от их проксимальных соседей (белая стрелка). С. Распределение дифференциальной экспрессии по хромосоме 3. Это подчеркивает понижающую регуляцию генов EDC из Vegf120/120 по сравнению с диким типом.

Фиг. 5А - группа IF= кератинов промежуточных филаментов (красные), прикрепленная к десмосоме (оранжевой), содержащей Dsc1. Pkp1 (фиолетовый) связывает промежуточные кератиновые филаменты с кадгериновыми белками соединений типа адгезионных контактов (желтый). Pkp1 также регулирует со-

держание белков в десмосоме. EDC и SCC кластеры генов взаимодействуют с кератинами промежуточных филаментов. Звездочкой выделены гены и кластеры генов с повышающей регуляцией в сети промежуточных филаментов. Повышающая регуляция Eps811 (кодирующего актин-кэппирующий белок), координирует ремоделирование промежуточных филаментов и актина.

Фиг. 5B - диаграмма разброса данных показывает по Y-оси значение каждого гена для определения того, отличается ли профиль экспрессии на протяжении эмбрионального возраста для эндотелиальных клеток генотипов *Vegf*^{+/+} и *Vegf*^{120/120} (на основе LIMMA). По X-оси показана кратность изменения индукции при сравнении двух генотипов, *Vegf*^{+/+} против *Vegf*^{120/120} на E16.5. Выделены кластеры генов *Krt*, *Dsc1*, *Pkp1*, EDC и SCC. *Krt* гены, подвергшиеся повышающей регуляции в клетках дикого типа *Vegf*^{+/+} *il*⁺, отличаются от *Krt* генов, экспрессированных в эквивалентных клетках дикого типа *ker*⁺. *Krt14* и *Krt1* являются генами, характерными для базальных клеток.

Фиг. 5C - иммунофлюоресцентное изображение (увеличение × 40) клеток, окрашенных GS-IB4 изолектином (*il*⁺ клеток) в легких эмбриона E16.5 дикого типа. У *Il*⁺ отмечается такая же самая архитектура, как у *ker*⁺ клеток из дистальных воздухоносных путей.

Фиг. 6 - диаграмма разброса данных на основе LIMMA анализа для группы клеток, окрашенных антителами к цитокератину 4-5-6-8-10-13-18. (Линейные модели для данных микроматричного анализа: Анализировали различия между *Vegf*^{120/120} нокаутными животными и однопометными животными дикого типа в профиле экспрессии на протяжении эмбрионального возраста, с помощью парного взаимодействия *Vegf* генотипа и времени). Выделены RIKEN cDNA 2200001115 ген и RIKEN cDNA 2310002J15 ген.

Фиг. 7 - диаграмма разброса данных на основе LIMMA анализа для группы GS-IB4-связывающих клеток. (Линейные модели для данных микроматричного анализа: Анализировали различия между *Vegf*^{120/120} нокаутными животными и однопометными животными дикого типа в профиле экспрессии на протяжении эмбрионального возраста, с помощью парного взаимодействия *Vegf* генотипа и времени). Выделены RIKEN cDNA 2200001115 ген и RIKEN cDNA 2310002J15 ген.

Фиг. 8 - выравнивание последовательности кДНК человеческого hR4RA транскрипта (= человеческого R2R¹) против мышинного R4Ra транскрипта (= мышинный R2R¹). Необходимо отметить, что наибольший контиг, сконструированный из последовательностей клонов RIKEN cDNA 2200001115 гена, обозначается как "мышинный R4Ra транскрипт (= мышинный R2R¹)".

Фиг. 9 - выравнивание белковой последовательности транслированного человеческого hR4RA (= человеческого R2R¹) транскрипта против транслированного мышинного R4Ra (= мышинного R2R¹) транскрипта.

Фиг. 10 - выравнивание последовательности кДНК человеческого hR4RD (= человеческого R2R²) транскрипта против транслированного мышинного R4Rd (= мышинного R2R²) транскрипта. Необходимо отметить, что наибольший контиг, сконструированный из секвенированных клонов RIKEN cDNA 2310002J15 гена, обозначается как "мышинный R4Rd транскрипт (= мышинный R2R²)".

Фиг. 11 - выравнивание белковой последовательности транслированного человеческого hR4RD (= человеческого R2R²) транскрипта против транслированного мышинного R4Rd (= мышинного R2R²) транскрипта.

Фиг. 12 - VEGF-A (VEGF¹⁶⁴) - зависимая повышающая регуляция R2R¹ при развитии межжелудочковой перегородки мышинного эмбриона. Красный - дикий тип, синий - VEGF^{120/120} нокаутной мыши, не имеющей VEGF¹⁶⁴ изоформы.

Фиг. 13 - экспрессия человеческого R2R² гомолога (=C9orf196) на протяжении времени (24-72 часа) в первичных эпителиальных клетках легких взрослого человека.

Фиг. 14 - нокдаун миРНК VEGF¹⁶⁵ приводит к нокдауну генов, ответственных за программу базальных клеток и программу плоскоклеточной дифференцировки. Нокдаун с помощью миРНК первичных клеток бронхиального эпителия (PBEC) человека надежно моделирует эффект от нокдауна интересующих генов, а) Количественная ОТ-ПЦР: миРНК-опосредованный нокдаун экспрессии VEGFA и VEGF¹⁶⁵ приводит к нокдауну экспрессии KRT14 (маркера базальных клеток). Относительная экспрессия KRT14 (PGK1 - нормализованная), VEGFA и VEGF¹⁶⁵ построена против миРНК. Включены два отрицательных контроля (обозначенные №№10 и 11). Экспрессия миРНК, направленной против KRT14, включена как положительный контроль. миРНК VEGFA направлена против всех изоформ VEGFA.

Фиг. 15A-J - глобальные изменения экспрессии генов, обусловленные миРНК-опосредованным нокдауном VEGFA в PBEC. Изменения в глобальной экспрессии генов точно соответствуют изменениям, наблюдающимся у *Vegf*^{120/120} нокаутной мыши. На графиках (a) - (j) изображено значение изменений экспрессии генов после применения миРНК, направленной против VEGF в течение 24 ч. График (a)-(j) созданы автоматизированным следовым анализом. Все пути вовлечены в дифференцировку кератиноцитов: регенерацию базальных клеток и плоскоклеточную дифференцировку.

Фиг. 16A-C - миРНК против гомологов человеческих R2R¹ и R2R². Гомолог(и) R2R¹ человека включает семейство FAM25, охватывающее семь человеческих паралогов, обозначенных FAM25A, FAM25B, FAM25C, FAM25D, FAM25E, FAM25G и FAM25HP. Они являются человеческими гомологами мышинных последовательностей, кодированных последовательностями кДНК, обозначенными

2200001115Rik или RIKEN cDNA 2200001115. Сходство FAM25 паралогов исключает проведение специфической количественной ПЦР с обратной транскриптазой различных паралогов. FAM25 паралоги также отсутствуют на биочипах экспрессирующихся генов человека Affymetrix, таких как HT HG-U133 или HT HG-U219. Мы выбрали для количественной ОТ-ПЦР набор праймер-зонд Hs04194072_m1 (Applied Biosystems) для определения дифференциальной экспрессии генов семейства FAM25. Applied Biosystems установил, что этот набор праймер-зонд не обеспечивает дифференцировки между различными паралогами. Три миРНК, сконструированные против семейства FAM25, были выбраны по их способности к понижающей регуляции Hs04194072_m1 экспрессии в РВЕС. Мы обозначили миРНК номерами 18, 20 и 22, соответственно. График (а) иллюстрирует понижающую регуляцию экспрессии FAM25 (Hs04194072_m1) (PGK1 нормализованной) спустя 24 ч после применения соответствующих миРНК в РВЕС. Гомолог R2R² человека: две миРНК (номер 15 и 17), сконструированные против C9orf169 (в концентрациях 5 и 20 нм, соответственно), были выбраны на основе их способности к понижающей регуляции экспрессии C9orf169 в РВЕС. Экспрессию C9orf169 оценивали микроматричным анализом и количественной ОТ-ПЦР. Зонды для C9orf169 присутствуют на Affymetrix HT HG-U219 биочипе экспрессирующихся генов человека. График (b) иллюстрирует понижающую регуляцию (оцениваемую микроматричным анализом) экспрессии C9orf169 спустя 24 ч применения соответствующей миРНК в РВЕС. Применение миРНК, направленной против семейства FAM25 или VEGFA, не влияло на экспрессию C9orf169. миРНК, направленная против R2R¹ (семейства FAM25 человека) и R2R² (человеческого C9orf169), обеспечивала понижающую регуляцию экспрессию KRT14, что являлось ответом, подобным ответу, наблюдаемому после применения миРНК, направленной против VEGFA и VEGF¹⁶⁵. Опосредованный миРНК нокдаун семейства FAM25 и C9orf169 приводил к понижающей регуляции экспрессии гена KRT14 (маркера базальных клеток). Этот ответ является наиболее очевидным после применения миРНК, направленной против C9orf169. График (c) иллюстрирует понижающую регуляцию экспрессии KRT14 (PGK1 нормализованной) спустя 24 часа после применения соответствующий миРНК в РВЕС. Включены также миРНК, направленные против VEGFA и KRT14, для сравнения.

Фиг. 17 - является схематическим представлением эффектов R2R гомологов. Экспрессия R2R гомологов ведет к одновременной модуляции передачи HIF1A сигналов (обеспечивая толерантность к кислороду) (блок 5), и модуляции специфического (PERP) анти-апоптотического пути (блок 4). Это обеспечивает (ре) генерацию здоровых эпителиальных клеток (с основным защитным барьером от стресса), без установки неограниченного ростового потенциала. Другими словами, модуляция специфического анти-апоптотического пути не вызывает общей толерантности к апоптозу. Общая толерантность к апоптозу может приводить к опасной ситуации иммортализации клеток -превращению клеток в раковые клетки. Путь был построен на основе микроматричного анализа миРНК - опосредованного нокдауна человеческого R2R¹ гомолога (семейство FAM25) и человеческого R2R² гомолога (C9orf169).

Фиг. 18 - R2R гомологи необходимы для "регенерации и дифференцировки кератиноцитов" (блок 1) и "модуляции апоптоза" (блок 2) в VEGFA - VEGF¹⁶⁵ пути. Влияние на экспрессию генов R2R гомологов для "регенерации и дифференцировки кератиноцитов" (блок 1) очевидно из фиг. 18А и 18В. Влияние на экспрессию генов R2R гомологов для "модуляции апоптоза" (блок 2) очевидно из фиг. 18С. Они являются окончательными эффектами из квадратов 3, 4 и 5.

Фиг. 19А-В - влияние на клеточное дыхание (см. Блок 3 на фиг. 17) является высоко специфичным: миРНК-опосредованный нокдаун R2R гомологов обеспечивает понижающую регуляцию окислительного фосфорилирования. Экспрессия R2R обеспечивает повышающую регуляцию окислительного фосфорилирования. Мы можем наблюдать этот эффект наиболее выраженным в отношении экспрессии митохондриальной АТФ5А1 - АТФ-синтазы (транспорта Н⁺) (фиг. 19А). миРНК, направленная на R2R гомологи, обеспечивает понижающую регуляцию экспрессии АТФ5А1. Фиг. 19В иллюстрирует экспрессию АТФ5А1 среди глобальных изменений экспрессии генов пути окислительного фосфорилирования.

Фиг. 20 - влияние R2R гомологов на передачу сигналов P53-P63 (см. Блок 4 на фиг. 17). Осуществляется понижающая регуляция PERP (TP53 эффектора апоптоза) посредством миРНК-опосредованного нокдауна человеческих R2R гомологов. PERP является р63-регулируемым геном, необходимым для целостности эпителия. P63 является главным регулятором развития многослойного эпителия, необходимым и достаточным для определения этой многоаспектной программы. Perp, мембранный белок из семейства тетраспанинов, который исходно был идентифицирован как апоптоз-ассоциированная мишень p53 супрессора опухоли, является первой прямой мишенью р63, явно опосредующего эту программу развития *in vivo* - это было продемонстрировано Rebecca A. Ihrie et al. in 2005 (Cell, Vol. 120, 843-856, March 25, 2005) (курсивом показан автор в реферате данной статьи). График демонстрирует понижающую регуляцию экспрессии PERP после миРНК опосредованного нокдауна человеческих R2R гомологов.

Фиг. 21 - обзор экспрессии PERP среди глобальных изменений экспрессии генов P53 пути после применения FAM25 №20 (направленного на человеческий гомолог R2R¹).

Фиг. 22 - обзор экспрессии PERP среди глобальных изменений экспрессии генов P53 пути после применения FAM25 №18 (направленного на человеческий гомолог R2R¹).

Фиг. 23 - обзор экспрессии PERP среди глобальных изменений экспрессии генов P53 пути после

применения C9orf169 №15 (направленного на человеческий гомолог R2R²).

Фиг. 24 - обзор экспрессии PERP среди глобальных изменений экспрессии генов P53 пути после применения C9orf169 №17 (направленного на человеческий гомолог R2R²).

Фиг. 25A-C - экспрессия HIF1A (см. блок 5 на фиг. 17) сильно регулируется экспрессией человеческих R2R гомологов. миРНК-опосредованный нокдаун человеческих R2R гомологов обеспечивает понижающую регуляцию HIF1A экспрессии (фиг. 25A). Влияние HIF1A на последующие звенья клеточного дыхания (окислительного фосфорилирования) описано в 3 (см. фиг. 17, "Клеточное дыхание"). R2R гомологи направляют экспрессию "PERP типа p53-p63" и HIF1A. Таким образом, "жесткие" эпителиальные клетки, оснащенные HIF1A арсеналом, могут развить неограниченный ростовой потенциал под влиянием VEGFA/VEGF¹⁶⁵. Однако мы наблюдаем в то же самое время, что эпителиальные клетки защищены от перехода в бессмертное состояние. Экспрессия R2R гомологов нарушает экспрессию генов, которые могут иммортализовать клетки. Это особенно явно в случае BCL2A1 (фиг. 25B), анти-апоптотического гена, чья экспрессия вызывает резистентность к терапии у раковых клеток. миРНК-опосредованный нокдаун R2R ведет к повышающей регуляции экспрессии BCL2A1. R2R гомологи разрушают экспрессию BCL2A1. R2R также стимулируют экспрессию генов, обеспечивающих апоптоз клеток при необходимости. Это демонстрируется миРНК-опосредованным нокдауном R2R гомологов: нокдаун вызывает понижающую регуляцию MAP2K4 (фиг. 25C) супрессора опухоли в аденокарциноме легких.

Табл. 1. RIKEN cDNA 2200001115 ген и RIKEN cDNA 2310002J15 ген среди основного списка генов при SAM анализе дифференциальной экспрессии генов в E16.5 в клетках дикого типа и нокаутных Vegf120/120 клетках при окраске с антителами к цитокератинам 4-5-6-8-10-13-18.

Табл. 2. RIKEN cDNA 2200001115 ген и RIKEN cDNA 2310002J15 ген среди основного списка генов при SAM анализе дифференциальной экспрессии генов в E16.5 в клетках дикого типа и нокаутных Vegf120/120 клетках при окраске GS-IB4.

Табл. 3. Распределение эмбрионов по возрасту и генотипу Vegf. dt/dt = гомозиготный дикий тип (Vegf+/+), 120/dt = гетерозиготный Vegf120/+ тип, и 120/120 = гомозиготный, Vegf120/120 нокаутный тип. (NG = не генотипирован из-за плохой морфологии эмбриона).

Таблица 1

№ пробы	вариант	UniGene ID	Выравнивания	Название гена	Символ гена
1448745_s_at	44.327	Mm.1121	chr3:92166199-92169061	лоркерин	Lor
1451613_at	25.931	Mm.208047	chr3:93405151-93418973	хорнерин	Hmr
1449986_at	21.731	Mm.160339	chr16:88647705-88648663	RIKEN cDNA 2310034C09 ген	2310034C09Rik
1440186_s_at	19.595	Mm.44242	chr5:36523188-36523428	RIKEN cDNA 2310020A21 ген	2310020A21Rik
1421575_at	18.532	Mm.358728	chr16:88666693-88667673	RIKEN cDNA 2310057N15 ген	2310057N15Rik
1453218_at	16.908	Mm.292458	chr3:92764649-92766321	RIKEN cDNA 1110014K05 ген	1110014K05Rik
1459897_a_at	16.677	Mm.250717	chr7:30460230-30464892	субрабазин	Sbsn
1420676_at	16.402	Mm.41969	chr3:92731934-92733718	малый пролин-обогащено-подобный 3	Spm3
1420358_at	13.819	Mm.353193	chr16:88647705-88709363	кератин ассоциированный белок 13	Krtap13
1437019_at	13.44	Mm.27156	chr14:33180971-33184466	RIKEN cDNA 2200001115 ген	2200001115Rik
1456248_at	12.776	Mm.46390	chr3:93078529-93078825	RIKEN cDNA 2310002A05 ген	2310002A05Rik
1434227_at	12.373	Mm.268157	chr7:30496664-30499855	связанный с дифференц. кератиноцитов	Krtapd
1420677_x_at	12.312	Mm.41969	chr3:92731934-92733718	малый пролин-обогащено-подобный -3	Spm3
1439630_x_at	12.212	Mm.250717	chr7:30463567-30464892	субрабазин	Sbsn
1420350_at	11.873	Mm.279773	chr3:92754015-92755718	малый пролин-обогащено-подобный -2	Spm2
1428781_at	11.64	Mm.30138	chr7:30485165-30489826	RIKEN cDNA 1110014F24 ген	1110014F24Rik
1452732_at	11.02	Mm.183043	chr6:86593812-86595336	RIKEN cDNA 2300003P22 ген	2300003P22Rik
1419394_s_at	10.266	Mm.21567	chr3:90754997-90755961	S100 кальций-связывающий белок A8 (c	S100a8
1453092_at	10.127	Mm.35806	chr3:93099607-93101077	RIKEN cDNA 2300002G24 ген	2300002G24Rik
1435111_at	9.396	Mm.32861	chr7:24063581-24063867	RIKEN cDNA 2310011E23 ген	2310011E23Rik
1419709_at	9.22	Mm.136573	chr16:36369769-36374633	стефин A3	Stfa3
1435761_at	9.202	Mm.383370	chr16:36196367-36204611	стефин A3	Stfa3
1422784_at	7.244	Mm.302399	chr15:101517949-10152263	кератиновый комплекс 2, основной, ген 6a	Krt2-6a
1435760_at	7.165	Mm.300592	chr18:42299151-42299711	цистатин A	Csta
1448756_at	6.71	Mm.2128	chr3:90778558-90781225	S100 кальций-связывающий белок A9 (c	S100a9
1447669_s_at	6.627	Mm.215394	chr13:13619774-13620011	гуанин-нуклеотид связывающий белок	Gng4
1425336_x_at	5.61	Mm.422886	chr17:33606481-33610733	гистосовместимости 2, K1, K регион	H2-K1
1437145_s_at	5.455	Mm.46431	chr2:25060827-25061091	RIKEN cDNA 2310002J15 ген	2310002J15Rik
1420741_x_at	5.247	Mm.291782	chr3:92862612-92864302	RIKEN cDNA 2310069N01 ген	2310069N01Rik
1442339_at	4.062	Mm.187847	chr16:36076009-36081118	стефин A2-подобный 1	Stfa2l1
1427492_at	3.963	Mm.34964	chrX:108755370-10876222	синдром истощения яичников 1B	Pof1b
1418722_at	3.693	Mm.236225	chr9:110265012-11026811	белок нейтрофильных гранул	Ngp
1419409_at	3.69	Mm.291769	chr3:92741051-92741651	малый пролин-обогащено-подобный 5	Spm5
1436936_s_at	3.42	Mm.274770	chrX:99684922-99685966	неактивные X-специфичные транскрипты	Xist
1427262_at	3.408	Mm.274770	chrX:99663093-99665936	неактивные X-специфичные транскрипты	Xist

1430567_at	3.377	Mm.35369	chr18:44114683-441478	ингибитор сериновой пептидазы, Kazal	Spink5
1422667_at	3.336	Mm.38498	chr11:99947848-999520	кератиновый комплекс 1, кислый, ген 15	Krt1-15
1448881_at	3.243	Mm.26730	chr8:112464257-112468	гаптоглобин	Hp
1423547_at	2.71	Mm.45436	chr10:116681442-11668	лизоцим	Lyzs
1449586_at	1.939	Mm.4494	chr1:137687809-137735	плакофилин -1	Pkp1
1449133_at	1.932	Mm.331191	chr3:92569339-9257128	малый пролин-обогащенный белок 1A	Spr1a
1449106_at	1.901	Mm.200916	chr11:54746194-547537	глутатион-пероксидаза 3	Gpx3
1452543_a_at	1.862	Mm.2258	chr19:9150684-9154982	секретоглобин, семейство 1A, член 1	Scgb1a1
1450633_at	1.859	Mm.21075	chr13:3837003-3837919	кальмодулин 4	Calm4
1459898_at	1.826	Mm.250717	chr7:30460230-304648	супрабазин	Sbsn
1429565_s_at	1.815	Mm.292457	chr3:93103210-931044	поздняя роговая оболочка 5A	Lce5a
1429540_at	1.727	Mm.34382	chr7:25076381-250784	корнифелин	Cnfn
1453801_at	1.597	Mm.180200	chr3:94427502-944325	суперсемейство тноэстеразы, член 5	Them5
1422672_at	1.568	Mm.140151	chr3:92522208-925241	малый пролин-обогащенный белок 1B	Spr1b

Таблица 2

Номер пробы	Вариант	UniGene ID	Наименование гена	Символ гена
1449586_at		32.877Mm.4494	плакофилин 1	Pkp1
1423935_x_at		30.173Mm.6974	Кератиновый комплекс 1, кислый, ген 14	Krt1-14
1460347_at		28.662Mm.6974	Кератиновый комплекс 1, кислый, ген 14	Krt1-14
1438856_x_at		23.207Mm.268618	Ингибитор сериновой (или цистеиновой) пептидазы, таксон В, член 5	Serpinb5
1422667_at		21.017Mm.38498	Кератиновый комплекс 1, кислый, ген 15	Krt1-15
1422481_at		20.962Mm.183137	Кератиновый комплекс 2, основной, ген 1	Krt2-1
1424096_at		20.14Mm.383993	Кератиновый комплекс 2, основной, ген 5	Krt2-5
1451613_at		20.135Mm.208047	Хорнерин	Hnr
1453218_at		18.792Mm.292458	RIKEN cDNA 1110014K05 ген	1110014K05Rik
1441941_x_at		18.5Mm.268618	Ингибитор сериновой (или цистеиновой) пептидазы, таксон В, член 5	Serpinb5
1456203_at		17.757---	RIKEN cDNA 1110020A10 ген	1110020A10Rik
1434227_at		16.95---	Белок, связанный с дифференцировкой кератиноцитов	Krdap
1429067_at		16.396---	Кальпани, малая субъединица 2	Capns2
1440186_s_at		16.186Mm.378865	Транскрибируемый локус	---
1419709_at		15.648Mm.136573	Стефин А3	Stfa3
1422939_at		14.807Mm.337362	Ингибитор сериновой (или цистеиновой) пептидазы, таксон В (овальбумин), член 3В	Serpinb3b
1422308_a_at		14.219Mm.20973	Лектин, связывающий галактозу, растворимый 7	Lgal7
1437019_at		13.876Mm.27156	RIKEN cDNA 2200001115 ген	2200001115Rik
1450633_at		13.842Mm.21075	Кальмодулин 4	Calm4
1421117_at		12.773Mm.336625	Дистонин	Dst
1421752_a_at		12.718Mm.268618	Ингибитор сериновой (или цистеиновой) пептидазы, таксон В, член 5	Serpinb5
1418799_a_at		12.316Mm.1225	протоколлаген, тип XVII, альфа 1	Coll17a1
1453801_at		11.671Mm.180200	Член 5 суперсемейства тноэстеразы	Them5
1422940_x_at		11.333Mm.337362	Ингибитор сериновой (или цистеиновой) пептидазы, таксон В (овальбумин), член 3В	Serpinb3b
1436392_s_at		11.112Mm.3629	Фактор транскрипции AP-2, гамма	Tcfap2c
1452166_a_at		10.901Mm.22662	Кератиновый комплекс 1, кислый, ген 10	Krt1-10
1449938_at		10.491Mm.1001	Плацентарный белок-11 связанный	Pp11r
1421040_a_at		10.27Mm.371562	Глутатион-S-трансфераза, альфа 2 (Yc2)	Gsta2
1437232_at		10.198Mm.107214	Белок, повышающий бактериальную проницаемость- подобный 2	Bpi2
1424623_at		9.782Mm.268618	Ингибитор сериновой (или цистеиновой) пептидазы, таксон В, член 5	Serpinb5
1418748_at		9.085Mm.20940	Каспаза 14	Casp14
1418158_at		9.029Mm.20894	Белок, связанный с трансформацией 63	Ttrp63
1430551_s_at		8.917Mm.195937	Липазо-подобный, содержащий домен аб-гидролазы 3	Lip13
1430550_at		8.679Mm.195937	Липазо-подобный, содержащий домен аб-гидролазы 3	Lip13
1435761_at		8.652Mm.136573	Стефин А3	Stfa3
1448397_at		8.545Mm.25652	Белок мешклеточных щелевых контактов мембранного канала бета 6	Cjib6
1459898_at		8.407Mm.250717	Супрабазин	MGI:2446326
1422672_at		8.373Mm.140151	Малый пролин-обогащенный белок 1В	Spr1b
1459897_a_at		8.371Mm.250717	Супрабазин	MGI:2446326
1428781_at		8.218Mm.30138	RIKEN cDNA 1110014F24 ген	1110014F24Rik
1419492_s_at		8.128Mm.5341	Дефензин бета 1	Defb1
1439183_at		8.102Mm.218784	N-ацилфингозин амидагидролаза (щелочная церамидаза) 3	Asah3
1419491_at		8.028Mm.5341	Дефензин бета 1	Defb1
1427263_at		7.99---	Неактивные X-специфические транскрипты	Xist
1416930_at		7.471Mm.878	Лимфоцитарного антигена б комплекс, локус D	Ly6d
1435760_at		7.251Mm.300592	Цистатин А /// подобный гомологу стеффина	MGI:3524930 ///
1439630_x_at		7.031Mm.250717	супрабазин	LOC547252
1435639_at		6.509---	RIKEN cDNA 2610528A11 ген	MGI:2446326
1424976_at		6.23Mm.120274	ras гомолог семейства генов, член V	2610528A11Rik
1455519_at		6.163Mm.383274	Десмоглен 1 бета	Rhov
1455715_at		5.932Mm.373656	PREDICTED: Mus musculus RIKEN cDNA 2700099C18 ген (2700099C18Rik), mRNA	Dsg1b
1434534_at		5.693---	---	---
1426048_s_at		5.603Mm.85544	Фактор транскрипции AP-2, альфа	Tcfap2a
1449500_at		5.535Mm.66015	Ингибитор сериновой (или цистеиновой) пептидазы, таксон В, член 7	Serpinb7
1430582_at		5.508Mm.133101	SNF2 гистон линкер PHD RING геликаза	Shprh
1435670_at		5.464Mm.137021	Фактор транскрипции AP-2 бета	Tcfap2b
1422588_at		5.427Mm.358617	Кератиновый комплекс 2, основной, ген 6b	Krt2-6b
1445187_at		5.408Mm.329504	RIKEN cDNA 9430070O13 ген /// модель гена 979, (NCBI)	9430070O13Rik ///
1421996_at		5.28Mm.85544	Фактор транскрипции AP-2, альфа	Gm979
1423323_at		5.278Mm.154045	Ассоциированный с опухолью трансдуктор кальциевого сигнала 2	Tcfap2a
1452228_at		5.242Mm.257819	RIKEN cDNA 4930451A13 ген	Tacst2
1449959_x_at		5.214Mm.23784	Малый пролин-обогащено-подобный 9	4930451A13Rik
1419731_at		5.211Mm.14098	Цитохром P450, семейство 2, подсемейство b, полипептид 19	Spr19
1442279_at		5.14Mm.312133	Усилитель гомолога rolycomb 1 (Дрозофила) (Erc1), вариант транскрипта 1, МРНК	Cyp2b19
1455408_at		5.008Mm.24880	RIKEN cDNA 473247207 ген	Erc1
1416271_at		4.925Mm.28209	PERP, TP53 эфektor апоптоза	473247207Rik
1418722_at		4.888Mm.236225	Белок нейтрофильных гранул	Pepr
1437351_at		4.809Mm.224814	Палец с CXHC 4	Ngr
1440162_x_at		4.662Mm.208144	Гипотетический белок A630043P06	Cxhc4
1426641_at		4.647Mm.266679	Гомолог tribbles 2 (Дрозофила)	A630043P06
				Trib2

1442349_at	4.643 Mm.259334	RIKEN cDNA C630028N24 ген	C630028N24Rik
1425624_at	4.593 Mm.209005	ERM2A (лафорин) взаимодействующий белок 1	Erm2aip1
1460038_at	4.577 Mm.297371	POU домен, класс 3, фактор транскрипции 1	Pou3f1
1440523_at	4.562 Mm.98096	Ретинальной короткоцепочечной дегидрогеназы редуктаза 2	MGI:2668443
1431211_s_at	4.438 Mm.180200	Член суперсемейства тиаэстеразы 5	Them5
1447329_at	4.351 ---	---	---
1443687_x_at	4.344 ---	---	---
1420988_at	4.306 Mm.311585	ДНК-полимераза, эта, (RAD 30 связанная)	Polh
1456248_at	4.189 Mm.46390	RIKEN cDNA 2310002A05 ген	2310002A05Rik
1430000_at	4.157 ---	RIKEN cDNA B230117O15 ген	B230117O15Rik
		Белок 2, связывающийся с полипиримидиновым трактом, мРНК (кДНК клон MGC:11671 IMAGE:3709255)	Ptbp2
1446490_at	4.154 Mm.29966	RIKEN cDNA 9530066K23 ген	9530066K23Rik
1441909_s_at	4.1 Mm.225253	Липоканн 2	Len2
1427747_a_at	4.035 Mm.9537	RIKEN cDNA 2310002J15 ген	2310002J15Rik
1437145_s_at	3.994 Mm.46431	Активируемый кальцием хлоридный канал 2	Clca2
1419463_at	3.985 Mm.20897	Связанный с аутофагией 4C (дрожжи)	Atg4c
1441440_at	3.976 Mm.277366	---	---
1437705_at	3.854 ---	---	---
1418028_at	3.846 Mm.19987	Допахром-таутомераза	Dct
1442786_s_at	3.804 Mm.270469	ДНК сегмент, хромосома 5, Brigham & Women's Genetics 0860 экспрессированный	D5Bwg0860c

Таблица 3

E7733 E12,5	A	дт/дт	E7734 E12,5	A	120/120
	B	дт/120		B	дт/120
	C	120/120		C	дт/120
	D	дт/120		D	дт/120
	E	дт/120		E	дт/120
	F	дт/дт		F	дт/120
	G	дт/дт		G	дт/120
	H	120/120		H	120/120
				I	дт/дт
		K	120/120		

E7232 E14.5	A	120/дт	E7494 E14.5	A	120/120
	B	120/дт		B	дт/дт
	C	120/120		C	120/дт
	D	дт/дт		D	120/дт
	E	120/дт		E	120/120
	F	120/дт		F	120/дт
	G	дт/дт		G	120/дт
	H	120/120		H	120/дт
	I	120/дт		I	дт/дт
	K	дт/дт			
	L	дт/дт			

E7119 E16.5	A	120/дт	E7477 E16.5	A	120/120	E7478 E16.5	A	120/120
	B	120/дт		B	дт/дт		B	дт/дт
	C	120/120		C	?		C	120/дт
	D	120/дт		D	120/+		D	120/дт
	E	120/дт		E	дт/дт		E	120/дт
	F	120/дт		F	дт/дт		F	120/120
	G	120/120		G	?		G	дт/дт
	H	120/дт		H	120/дт		H	120/дт
	I	дт/дт		I	120/дт		I	120/дт
	J	120/дт		K	120/дт		K	дт/дт
	K	120/дт		L	120/120		L	120/120
	L	120/дт					M	дт/дт

Введение

R2R гены, транскрипты и соответствующие белки были открыты на VEGF мышью нокаутной модели. Vegf120/120 нокаутные мыши неспособны продуцировать Vegf¹⁶⁴ и Vegf¹⁸⁸ изоформы (Vegf¹⁶⁴ является гомологом человеческого VEGF¹⁶⁵). Легкие Vegf120/120 нокаутной мыши являются гипопластическими при рождении, и периферические воздухоносные пути и сосудистая дифференцировка тяжело нарушаются в Vegf120/120 нокаутных эмбриональных легких. Геномный подход привел к открытию того, что Vegf¹⁶⁴ у мышей и VEGF¹⁶⁵ у человека управляют очень специфической программой экспрессии генов. Эта программа состоит из двух компонентов. Первым компонентом является (ре)генерация базальных клеток эпителия воздухоносных путей: базальные клетки являются источником по меньшей мере популяции клеток в проксимальных воздухоносных путях. Базальные клетки также образуют сильное межклеточное соединение путем построения хемидесмосомы и фокальных адгезионных соединений. Базальные клетки укрепляют внутриклеточную архитектуру посредством белков промежуточных филаментов KRT14 и KRT5. Эти два белка присоединены к (хеми)десмосоме.

Вторым компонентом является программа дифференцировки: это "программа укрепления" (плоско-

клеточной дифференцировки) клеток, выстилающих воздухоносные пути. Эти клетки должны быть жесткими при рождении, поскольку они будут подвергаться механическому стрессу и воздействию высоких уровней кислорода. Укрепление возможно благодаря семейству белков, усиливающих клеточную архитектуру. Это семейство белков состоит из группы промежуточных филаментов, и белков, укрепляющих промежуточные филаменты (SPRR белков, LOR, HRNR, и т.д.). Эти две программы можно обобщить под заголовками "дифференцировка кератиноцитов", "дифференцировка эпителиальных клеток", "реорганизация промежуточных филаментов", "роговая оболочка", "кератиновые филаменты, ремоделирующие цитоскелет".

В то как перспективно применять VEGF¹⁶⁵ белок для регенерации поврежденных легких у человека, VEGFA и VEGF¹⁶⁵ являются важными регуляторами широкого ряда процессов в организме. Следовательно, применение VEGFA от VEGF¹⁶⁵ может привести к слишком многим побочным эффектам.

Были открыты два новых гена (R2R¹ и R2R²) в программе экспрессии генов, которые управляются Vegf¹⁶⁴ у мышей и VEGF¹⁶⁵ у человека. Эти новые гены, их транскрипты и транслированные белки не связаны с генами и их продуктами из поздних звеньев программы экспрессии базальных и плоскоклеточных генов.

Были проведены эксперименты для демонстрации того, что эти гены являются важными модуляторами программы базальной и плоскоклеточной дифференцировки. Одной из наиболее важных находок этих экспериментов является то, что эти гены являются важными модуляторами экспрессии HIF1 α и PERP в клетках. В наших экспериментах R2R гены являются позитивными регуляторами, и интерференция с данным механизмом открывает терапевтические возможности в лечении рака.

Материалы и методы

Мышиные эмбрионы и обработка тканей.

Все эксперименты на животных были утверждены Этическим Комитетом по исследованиям на животных в Медицинском центре Лейденского университета, и выполнены в соответствии с Руководством по уходу и применению лабораторных животных, опубликованным Национальным институтом здоровья. Гетерозиготных Vegf⁺/120 мышей скрещивали для получения эмбрионов Vegf120/120 и одноплетных мышей дикого типа Vegf⁺/+. По утрам по вагинальной пробке определяли возраст эмбриона в сутках (E) 0,5. Беременных самок умерщвляли цервикальной дислокацией. Эмбрионов E12.5, 14.5 и 16.5 изолировали в стерильном ФБР. Грудные клетки эмбрионов осторожно разрезали в условиях, свободных от рибонуклеазы, помещали в среду для замораживания тканей (TBS, Triangle Biomedical Sciences, Дарем, Северная Каролина), замораживали и хранили при -80°C. Распределение эмбрионов по возрасту и происхождению представлено в табл. S1.

Получали срезы с помощью криостата (8 мкм), и прикрепляли к слайдам для микроскопии Super-Frost Plus (Menzel Gmbh & Co KG, Брауншвейг, Германия). Получение срезов и другую иммуногистохимическую обработку грудных клеток эмбрионов различного возраста проводили произвольно.

Иммуногистохимия и лазерная захватывающая микродиссекция.

Три среза ткани от каждой грудной клетки эмбриона выбирали на уровне вида сердца с двумя желудочками. Срезы подвергали иммуногистохимической обработке в одной партии. Криостатические срезы фиксировали, помещая их в холодный ацетон (4°C) на 2 минуты после извлечения из -80°C морозильника. Все дополнительные иммуногистохимические этапы проводили при 4°C, и все буферные растворы и растворы антител хранили при 4°C. Буферный раствор, не содержащий рибонуклеазы, или D-PBS буферный раствор готовили путем разбавления RNAsecure (25x, AM7006, Ambion TX) до 1x в используемом буферном растворе. Все растворы антител готовили в ФБР, в то время как изолектин GS-IB4 конъюгат разбавляли в D-PBS. Superase.In (AM2696, Ambion, Остин, Техас) добавляли к каждому раствору антител в конечной концентрации 1 Ед/мл. Слайды сушили на воздухе, и срезы тканей ограничивали карандашом для гидروفобного барьера. После помещения слайдов на холодный металлический блок (4°C), 30 мкл ФБР наносили на каждый тканевой срез, и сушили. Затем 30 мкл анти-кератин (4, 5, 6, 8, 10, 13, 18) моноклональных антител (MAV1636, Chemicon) в концентрации 10 мкг/100 мкл наносили на образец. Раствор антител высушивали спустя 2 минуты, и срез ткани осторожно промывали 250 мкл ФБР. 30 мкл Alexa-fluor-488 куриного анти-мышинного IgG (H+L) конъюгата (A21200, Invitrogen, Калифорния) в концентрации 10 мкг/100 мкл, наносили затем на 2 мин, затем опять осторожно промывали 250 мкл ФБР. Наконец, третий цикл 2-минутного окрашивания с 30 мкл изолектин GS-IB4 Alexa Fluor 594 конъюгата (121413, Invitrogen, Калифорния) в концентрации 10 мкг/100 мл завершал процедуру окрашивания. Тканевые срезы подвергали дегидратации при комнатной температуре: 75% EtOH (30 с), 95% EtOH (30 с), 100% EtOH (30 с), 100% EtOH (120 с), ксилол (180 сек). Лазерную захватывающую микродиссекцию проводили на приборе для микродиссекции Veritas Microdissection Instrument (Arcturus Bioscience Inc., Маунтин-Вью, Калифорния) немедленно после этапов дегидратации. Мы готовили срезы из 3x 300 - 400 клеток (в виде образцов в трех повторностях) из внутрилегочных воздухоносных путей или кровеносных сосудов в эмбриональных легких на тканевых срезах на уровне обоих желудочков сердца. Клетки, окрашенные моноклональными антителами к мышинному панкератину/куриным анти-мышинным IgG Alexa-fluor-488 конъюгатом, были идентифицированы как зеленые флюоресцирующие клетки (синий фильтр).

Эти зеленые флюоресцирующие клетки были определены как эпителиальные клетки воздухоносных путей (ker+ клетки), и были произвольно выделены, независимо от их морфологии характерной для проксимальных или дистальных воздухоносных путей. Клетки, окрашенные изолектин GS-IB4 Alexa-fluor-594 конъюгатом, были идентифицированы как красные флюоресцирующие клетки (зеленый фильтр). Эти клетки были определены как мезенхимальные клетки с эндотелиальными характеристиками (il+ клетки). Окрашивание клеток обоими маркерами не наблюдалось на трех точках эмбрионального развития (E 12.5, 14.5, 16.5). Фактически, зеленые и красные флюоресцирующие клетки можно было наблюдать как позитивное/негативное изображение друг друга. Подвергнутые микродиссекции ker+ или il+ клетки собирали в пробирку Gene Amp (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния), заполненную 75 мкл RNeasy литического буферного раствора (RLT; Qiagen, Хильден, Германия), содержащего 0,14M бета-меркаптоэтанол и 200 нг полиинозиновой кислоты (Sigma).

Выделение, амплификация, маркировка, и микроматричная гибридизация РНК.

Захваченные лазером образцы инкубировали при 42°C в течение 20 мин, а затем охлаждали на льду. Образцы хранили при -80°C перед дальнейшей обработкой. После оттаивания равный объем 70% этанола добавляли в каждый образец, а затем переносили на колонки RNeasy MinElute Spin Columns (Qiagen). РНК очищали в соответствии с инструкциями производителя, элюировали 14 мкл воды, не содержащей рибонуклеазы, и доводили до 4 мкл вакуумной сушкой. Два цикла линейной мРНК амплификации было необходимо для образования достаточных количеств кРНК. Два цикла синтеза кДНК и синтез биотин-маркированной кДНК проводили в соответствии с руководством "GeneChip Eukaryotic Sample and Array Processing Manual" ("Руководство по обработке генного чипа эукариотического образца и матрицы") (Affymetrix, Санта-Клара, Калифорния). В качестве контроля извлечения использовали контрольный набор GeneChip Poly-A RNA control kit (Affymetrix). MEGAscript T7 kit (Ambion, Остин, Техас) использовали для транскрипции *in vitro* второй нити кДНК в первом цикле амплификации, получая 112-457 нг аРНК. Во втором цикле амплификации, начиная от 100 нг аРНК из первого цикла, получали 11-86 мкг кРНК с применением набора для маркировки транскрипции *in vitro* (IVT) GeneChip. Маркированную РНК гибридизовали в мышинных геномных матрицах GeneChip (Affymetrix). Гибридизацию проводили с применением 12,5 мкг маркированной биотином РНК при 45°C в течение 16 часов при непрерывном вращении. Матрицы окрашивали в установках Affymetrix Fluidics stations с применением стрептавидина-фикоэритрина (SAPE), с последующим окрашиванием антителами к стрептавидину, и вторым SAPE окрашиванием. Затем матрицы сканировали на инструменте Agilent Laserscanner (Affymetrix).

Статистический анализ.

Данные по уровню зонда Affymetrix обобщали с применением FARMS (Факторного анализа для робастного суммирования микроматриц)¹. Необработанные интенсивности подвергали логарифмической трансформации для получения нормального распределения данных. Вначале неконтролируемый многовариантный метод проекции, анализ спектральных карт², применяли для снижения сложности слишком многомерных данных (n генов против p образцов). Анализ спектральных карт обеспечивал объективную идентификацию преобладающих кластеров генов и предметов, присутствующих в наборе данных. Во-вторых, тесты для дифференциальной экспрессии генов между клетками двух видов (ker+ против il+ клеток) проводили в LIMMA (линейных моделях для данных микроматриц)³, поскольку этот анализ использует информацию для совокупности генов, делая анализ стабильным даже в экспериментах с малым количеством матриц³. В-третьих, различия между однопометными Vegf120/120 нокаутными мышами и мышами дикого типа по профилям экспрессии на протяжении эмбрионального периода тестировали с помощью взаимодействия двух факторов, Vegf генотипа и времени, вновь с помощью LIMMA³. Данные по E12.5 и E14.5 были собраны, поскольку нас интересовал контрастный временной профиль E16.5 против E14.5 и E12.5. Этот тест проводили на образцах ker+ и il+ по отдельности, поскольку эти две ткани были получены из одних и тех же эмбрионов. Такие модели, как LIMMA обеспечивают произвольный и независимый сбор всех образцов. Коррекция этой зависимости требует более сложной модели, если анализировать ker+ и il+ одновременно. Геномные вариации при единичном взаимодействии типа ткани (образцы ker+ против il+) также обнаруживаются посредством LIMMA анализа. Распределение дифференциальной экспрессии по всему геному определяли с применением MAST (инструмента для микроматричного хромосомного анализа).

Результаты/Обсуждение

При рождении необходим обмен O₂ и CO₂ в легких на большой границе раздела воздухоносных путей и кровеносных сосудов. Эмбриональное развитие легких у мышей подвергается сильному сдвигу при E (= сутки после зачатия) 16.5¹. В это время переплетенные воздухоносные пути и сосудистая сеть распускаются путем умножения и усовершенствования их дистальных ветвей. Дистальные воздухоносные пути или респираторные трубки умножаются путем подразделения тонкостенных мешочков перед рождением. Эти мешочки развиваются в итоге в постнатальные альвеолы². Для тонкостенных воздухоносных путей необходимы плоские клетки для облегчения транспорта газа. Таким образом, фенотипическая дифференцировка в плоские клетки воздухоносных путей, происходящая около E16.5, является критической фазой эмбрионального развития легких. Эпителиальные клетки, покрывающие воздухоносные пути,

происходят из разветвленной энтодермы головной кишки. От E16.5, эпителиальные клетки в дистальных воздухоносных путях начинают уплощаться, в то время как проксимальные клетки сохраняют свою столбчатую форму. Наиболее дистальные из этих клеток будут выстилать мешочки и альвеолы, и развивать плоскую или даже чешуйчатую морфологию на E18.5. Капилляры выстланы с плоскими эндотелиальными клетками и представляют дистальные кровеносные сосуды сосудистой сети. Эндотелиальные клетки, покрывающие легочные кровеносные сосуды, происходят из мезодермальной мезенхимы. Их рост должен тесно соответствовать росту их эпителиальных аналогов, чтобы обеспечить большую альвеолярно-капиллярную границу раздела, через которую начинается газообмен при рождении. Реципрокное взаимодействие между эпителием воздухоносных путей, произошедшим из энтодермы, и окружающей мезодермальной мезенхимой, начинается в раннем морфогенезе легких^{3,4}. Начиная от E9.5, Fgf10, продуцируемый мезенхимальными клетками в окружающей мезодерме, является наиболее важным сигналом для разветвления энтодермы. Тесное взаимодействие по меньшей мере с Shh, Bmp, TGF- β , и Wnt факторами передачи сигнала модулирует этот ранний механизм разветвления. Однако, молекулярный механизм, лежащий в основе поздних клеточных фенотипических изменения и эпителиально-эндотелиального взаимодействия при E16.5 менее изучен.

Для дальнейшего изучения поздней дифференцировки легких после E12.5, мы разработали основанную на РНК процедуру иммунохимического окрашивания для лазерной захватывающей микродиссекции эпителиальных клеток в развивающихся воздухоносных путях. Мы предположили, что определение профиля экспрессии поздних генов с помощью РНК, выделенной из клеток воздухоносных путей, разделяющих общий эпителиальный антиген в различном эмбриональном возрасте, позволит выяснить их транскрипционные изменения со временем. Эта программа должна по меньшей мере отразить характеристики эпителия, предпочтительно типа воздухоносных путей легких. То же самое предположение проверяли на легочных клетках, маркированных эндотелиальным маркером, универсально экспрессируемым в различном эмбриональном возрасте. Кроме того, мышиную нокаутную модель с поздним аномальным морфогенезом разветвления в легких, включили в данный подход. Мы выбрали Vegf120/120 модель, поскольку периферическая дифференцировка воздухоносных путей и сосудов^{5,6,7} серьезно повреждается в этих Vegf120/120 нокаутных эмбриональных легких. Эпителиальные и эндотелиальные клетки дикого типа, как ожидалось, экспрессировали набор генов дифференцировки воздухоносных путей и сосудов, не имевшийся у их Vegf120/120 нокаутных аналогов. Vegf120/120 мыши не имели VEGF-A изоформ 164 и 188, но экспрессировали изоформу 120. VEGF-A изоформы 164 и 188 (VEGF164 and VEGF188) наиболее тесно связаны с экстрацеллюлярным матриксом, чем более растворимый VEGF120 вариант, и концентрируются локально вокруг дистальных воздухоносных путей. Стандартная точка зрения устанавливает, что легочные эпителиальные клетки секретуют эти VEGF-A изоформы, в то время как VEGF164 и VEGF188 поощряют локальный рост легочных эпителиальных клеток через стимуляцию рецептора тирозин-киназ Flk1 (VEGF рецептор-2) и Flt1 (VEGF рецептор-1). Ограниченная экспансия эндотелиальных клеток совершенствует легочную сосудистую сеть и обеспечивает соответствующий рост эпителиальных клеток^{8,9}. Это эпителиально-эндотелиальное взаимодействие обеспечивает газообмен при рождении путем формирования тесной связи между альвеолами дистальных воздухоносных путей и капиллярами легочной сосудистой сети. Однако, этот тип взаимодействия не может объяснить присутствие VEGF-A в мезенхимальных клетках, окружающих эпителиальные клетки дистальных воздухоносных путей.

Иммунохимическое окрашивание проводили на срезах замороженных тканей из грудных клеток эмбрионов на E12.5, E14.5 и E16.5 (фиг. 2). Геномное распределение эмбрионов показано в табл. S1. Мы выбрали антитела, обеспечивающие достаточную пропускную способность для связывания с эпителиальными или эндотелиальными антигенами в границах эмбрионального периода в нашем исследовании. Анти-цитокератиновые антитела (направленные против цитокератина 4, 5, 6, 8, 10, 13, и 18) были выбраны для маркировки эпителиальных клеток (ker+ клеток), выстилающих воздухоносные пути, поскольку примитивнее и дифференцированные эпителиальные клетки глобально экспрессируют промежуточные филаменты различных кератинов. Эндотелиальные клетки в одном и том же срезе ткани окрашивали изолектин GS-IB4 (*Griffonia simplicifolia*) Alexa-fluor-594 конъюгатом, который связывается с ранними¹⁰ и поздними эндотелиальными клетками^{11,12} у мышей (il+ клетками). Окрашивание клеток обоими иммуногистохимическими маркерами не наблюдалось в трех моментах времени эмбрионального развития. 300 - 400 ker+ и il+ клеток избирательно изолировали путем лазерной захватывающей микродиссекции. Два цикла линейной мРНК амплификации обеспечили достаточное количество кРНК для гибридизации на матрицах Affymetrix Mouse 430_2.0 Genechips.

Во первых, мы исследовали, отражает ли определение профиля экспрессии генов, регулирующих последующие звенья сигнальных каскадов, дифференцировку с возрастом в зависимости от эпителиального и эндотелиального происхождения. Данные исследовательского, неконтролируемого анализа экспрессии генов установили, что экспрессия генов меняется во время эмбрионального развития с учетом наибольшей вариации (35%) в наборе данных. Эта вариация графически представлена в первом основном компоненте (X-оси или PC₁) спектральной карты¹³ (фиг. 3). Гены, проявляющие наибольшие изменения экспрессии на протяжении трех стадий эмбрионального развития, находились на краях X-оси.

Один из этих генов, сурфактант-ассоциированный белок С (Sftpc), как известно, осуществляет важную физиологическую повышающую регуляцию во время эмбриогенеза, и достаточные количества его белкового продукта необходимы для нормального дыхания при рождении^{14,15}. Второй основной компонент (Y-ось или PC₂), объясняющий другие 17% вариации в наборе данных, может быть связан с различиями в экспрессии генов в зависимости от клеточного происхождения. Некоторые из наиболее крайних проб, установленных по PC₂ оси, представляют гены, которые, как известно, являются характерными для легочного эпителия или эндотелия. Среди восьми наиболее крайних наборов проб, мы идентифицировали CD 93 антиген (CD93)¹⁶ и клаудин 5 (Cldn5)¹⁷ в качестве иллюстративных эндотелиальных генов, и на противоположной стороне Y-оси, фактор семейства Forkhead, блок A1 и кератин 8 (Krt8)¹⁹ в качестве экспрессируемых эпителиальных генов. Наложение различных образцов на спектральную карту показало их распределение по двум основным компонентам. Группы ker+ и il+ были ясно разделены в соответствии с их клеточным происхождением по PC₂ (фиг. 3). Ker+ образцы группировались вместе с генами эпителиального типа, а il+ образцы были собраны вместе с генами эндотелиального типа. Оба вида клеточного происхождения собирались вместе с PC₁ в одном и том же эмбриональном возрасте. Это указывало, что общие изменения экспрессии генов развития были подобными для эпителиальных (ker+) и эндотелиальных (il+) клеток. В целом, образцы группировались вместе в зависимости от клеточного происхождения (ker+ против il+ клеток) и эмбрионального возраста, при использовании анализа с неконтролируемыми управляемыми данными. Анализ спектральной карты подчеркивает, что избирательная лазерная захватывающая микродиссекция обеспечивает хорошее разрешение профилей экспрессии генов. Независимый контролируемый одномерный (от гена к гену) анализ влияния тканевого происхождения образцов (ker+ против il+) дополнительно подтвердил, что ker+ и il+ клетки соответствуют на геномном уровне эпителиальным или эндотелиальным клеткам, соответственно (фиг. 1).

Далее, в il+ и ker+ клетках был выявлен транскрипционный профиль, связанный с аномальным морфогенезом разветвления в Vegf120/120 нокаутном фенотипе. Для каждого гена мы анализировали, имеются ли существенные различия профиля экспрессии на протяжении эмбрионального возраста между однопометными мышцами Vegf120/120 нокаутного и дикого типа (Vegf+/+). Эти различия в зависимом от возраста профиле экспрессии между Vegf+/+ и Vegf120/120 развертывают геномную карту в трех направлениях. Имеются несколько генов, идентифицированных только при явной повышающей регуляции Vegf+/+ генотипа на протяжении эмбрионального возраста, например, Hmg (фиг. 2). Vegf120/120 генотип ослаблялся при индукции, зависимой от возраста.

Во-первых, причина структурного дефицита в воздухоносных путях Vegf120/120 нокаутных легких становится явной. Клетки дикого типа ker+ экспрессируют избыток 44 эпителиально-специфических генов в E16.5, по сравнению с их Vegf120/120 нокаутными аналогами. Группа генов комплекса эпидермальной дифференцировки (EDC) преобладает в профиле экспрессии (фиг. 4). S100a8 и S100a9, изображенные среди этого EDC субнабора, и как известно, являются VEGF-A зависимыми²⁰ хемоаттрактантами. Другие элементы EDC, такие как гены малого пролин-обогащенного участка (Sprt), и поздние компоненты эпидермального рогового конверта, также представлены. Цитоскелетный кератин Krt2-6 совместно экспрессировался с EDC суб-набором в клетках дикого типа ker+ на E16.5. Ингибиторы сериновых-цистеиновых протеиназ и три гена SCC (гена, кодирующего белок, секретируемый плоскоклеточным эпителием) комплекса, завершали группу генов, подвергающихся повышающей регуляции (фиг. 4).

Исследование взаимодействия между эмбриональным возрастом и генотипом в клетках дикого типа il+ обнаружило выраженную повышающую регуляцию ограниченного набора генов в E16.5. Этот ответ ведет к приему эпителиально-специфической программы трансформации в клетках дикого типа il+ в E16.5, по сравнению с Vegf120/120 нокаутными клетками. Как в клетках дикого типа ker+, EDC кластер, SCC кластер, ингибиторы цистеиновых протеиназ и эксклюзивные кератиновые гены явно подвергались повышающей регуляции на протяжении эмбрионального возраста. Riken1110020A10, соответствующий Dsc1 гену, подвергался повышающей регуляции в клетках дикого типа il+ в E16.5. Далее, Pkp1 (плакофилин 1) отображал идентичный профиль транскрипции в E16.5 (фиг. 5). Как кажется, высоко логичный режим управляет кластерной повышающей регуляцией этих генов. Кератины и белки промежуточного филамента обеспечивают структурную прочность этих клеток, наиболее типично эпителиальных клеток²¹. Белки, кодированные EDC и SCC кластером, и ингибиторы сериновых-цистеиновых протеиназ, укрепляют эту кератиновую сеть. Dsc1 (десмоколлин 1) кодирует один из белков, формирующих десмосомы^{22,23}. Промежуточные кератиновые филаменты связаны с межклеточными десмосомами, формирующими клеточное соединение вместе с щелевыми контактами и адгезионными контактами. Белок, кодируемый Pkp1, является основным из позитивных регуляторов содержания десмосомального белка^{24,25}, и сам является компонентом десмосомального комплекса. Pkp1 также связывает промежуточные кератиновые филаменты с кадгериновыми белками в адгезионных контактах. Эти результаты идентифицировали стимуляцию рецептора тирозин-киназы VEGF-A изоформами 164 и 188 в качестве основного переключения в сборке десмосомальной/промежуточной филаментной структуры в легких. Этот механизм добавляет другой строительный блок к цитоскелетной и межклеточной архитектуре наверху Wnt/ β -катенин-зависимого адгезионного соединения (E-кадгерина). Фактически, повышающая регуляция Eps811 в E16.5 в клетках дикого типа il+ открывает еще прямую интерференцию с актином, ключевым

структурным белком, не связанным с системой промежуточных филаментов. Координированная и кластерная экспрессия этих цитоскелетных и десмосомальных генов обеспечивает формирование плоскоклеточной системы в дистальных воздухоносных путях.

Во-вторых, помимо активации генов, кодирующих специфические структурные белки, интригующей находкой оказалась повышающая регуляция Маркарк3 в клетках дикого типа *il+* в E16.5. Маркарк3 интегрирует пути передачи ERK и p38 сигналов²⁶ при стрессе и митогенном ответе, таком как при стимуляции VEGF-A эндотелиальных клеток. *Cdkn2b* (*p15^{ink4b}* или *Ink4b*), части *Ink4b-ARF-Ink4a* локуса супрессии опухоли, одновременно подвергались повышающей регуляции. Надежные данные указывают на супрессию этого локуса связанными репрессорными комплексами группы *polycomb* (*Pcg*). Дерепрессия локуса происходит при диссоциации *Pcg* комплексов путем активации или избыточной экспрессии Маркарк3²⁷. Этот тормозной рычаг в клеточном цикле обеспечивает дифференцировку при пролиферативных стимулах²⁸, и был продемонстрирован здесь вначале *in vivo*. В сущности, остановка клеточного цикла, обеспечивающая эпителиальную трансформацию *il+* клеток, является VEGF164- и VEGF188-зависимой в легких. Удивительно, что повышающая регуляция *Krt5*, *Krt14* и *Tcfap2c* была очень похожа на профиль экспрессии предшественников базальных клеток в эпителии воздухоносных путей²⁹. Фенотип базальных клеток проявляется только при рождении в эпителии воздухоносных путей легких, и обычно связан с изолектином. С другой стороны, экспрессия кластеров генов *Krt1*, *EDC* и *SCC* является программой плоскоклеточной дифференцировки. Белки $\Delta Np63$ и $\Delta Aap63$ направляют программу предшественника кератина и программу плоскоклеточной дифференцировки, соответственно. Ген *Ttrb3*, кодирующий эти два белка, подвергается повышающей регуляции в клетках дикого типа *il+*. Как упоминалось, окрашивание клеток антителами к цитокератину (анти-4, 5, 6, 8, 10, 13, и 18) и изолектином GS-IB4 не наблюдалось в исследуемые моменты времени. Отсутствие *Krt1* и *Krt14* связывания антителами к цитокератину позволило идентифицировать специфическую программу эпителиальной трансформации клеток дикого типа *il+* в E16.5. Кажется маловероятным, что эпителиальные клетки *ker+* генерируют эту эпителиальную транскрипционную программу. Это потребует утраты способности к связыванию антителами к цитокератину, чтобы избежать *ker+* маркировки. В то же самое время *ker+* клетки должны приобрести исключительное изолектин- GS-IB4 окрашивание. В результате мы предположили, что легочные *il+* имеют резервуар клеток, растущих в зрелый эпителий в E16.5. Другими словами, легочные мезенхимальные *il+* клетки охватывают клетки с эндотелиальной и эпителиальной компетенцией.

В третьих, ген, представленный зондом Affymetrix 1437019 at (RIKEN cDNA 2200001I15 ген) и ген, представленный зондом Affymetrix 1437145 s at (RIKEN cDNA 2310002J15 ген), подвергались повышающей регуляции в E16.5 в эпителиальных клетках дикого типа, окрашенных антителами к цитокератину 4-5-6-8-10-13-18, и клетках дикого типа, связывающих GS-IB4. Мы установили, что эти два гена (не имеющие биологической аннотации) ко-экспрессируются с плоскоклеточной и базально-клеточной транскрипционной программой. Они играют важную роль в продукции и регенерации дифференцированных клеток воздухоносных путей (фиг. 6, фиг. 7, табл. 1, табл. 2). Начиная с самого длинного контига, сконструированного из секвенированных клонов, мы открыли человеческий гомолог транскрипта гена RIKEN cDNA 2200001I15 (фиг. 8) и транскрипта гена RIKEN cDNA 2310002J15 (фиг. 10). Далее, выравнивания белковых последовательностей подтвердили существование человеческого гомологического белка для соответствующего транслированного белка гена RIKEN cDNA 2200001I15 (фиг. 9) и гена RIKEN cDNA 2310002J15 (фиг. 11). Мы предложили наименование R2R¹ для гомологов млекопитающих для гена RIKEN cDNA 2200001I15, транскрипта и белка, и R2R² для гена RIKEN cDNA 2310002J15, транскрипта и белка, поскольку эти гены и их белковые продукты ответственны за функцию регенерации в респираторной системе.

В-четвертых, мы установили, что VEGF-A экспрессируется в *ker+* и *il+* клетках, независимо от дикого типа или *Vegf120/120* нокаутного статуса. Далее, ген, кодирующий VEGF рецептор 1 (*Flk-1* или *Kdr*), в большом количестве экспрессировался в *il+* клетках, но также существенно повышался уже в E14.5 в *ker+* клетках. Этот вид экспрессии VEGF-A и VEGF рецептора меняет классическую точку зрения на то, что мезенхима пассивно ожидает VEGF-A стимул из легочного эпителия. Это по существу подтверждает недавнюю работу, демонстрирующую необходимость эндогенной экспрессии VEGF-A и аутокринной передачи сигналов для выживания эндотелиальных клеток^{30,31}. Из геномного картирования дикого типа против *Vegf120/120* нокаутных *il+* клеток, также ясно, что *il+* cells часто ответственны за отправку стимулов эпителиальной трансформации. Повышающая регуляция *Fgfbp1*, *Lgals7*, *Lgals3* и *Il18* в клетках дикого типа *il+* в E16.5 представляет эти стимулы. Эта повышающая регуляция гена, кодирующего связывающий фактор роста фибробластов белок 1 (*Fgfbp1*), указывает, что первичное FGF-контролируемое почкование легких также происходит на конечных стадиях легочной дифференцировки. *Fgfbp1* действует путем концентрирования FGF2, и является тонким модулятором роста и дифференцировки эпителиальных тканей в ответ на FGF стимулы от мезенхимы. Ген рецептора FGF 2 (*Fgfr2*) был в этом отношении интенсивно экспрессирован в *ker+* и *il+* компартменте.

В итоге, была проведена избирательная лазерная захватывающая микродиссекция клеток, разделяющих специфический маркер в различном эмбриональном возрасте. Это позволило дифференцировать профили экспрессии генов в отношении эмбрионального возраста, клеточного происхождения и *Vegf*

генотипа. Транскрипционная программа, выявленная с помощью этого подхода, подчеркнула важность промежуточных филаментов и десмосомальной сети в доработке легочной архитектуры. Этот механизм добавляет другой строительный блок в цитоскелетную и межклеточную архитектуру наверху Wnt/ β -катенин-зависимого адгезионного соединения (E-кадгерина). Промежуточные филаменты обеспечивают необходимую прочность клеток, подвергающихся сильному воздействию механического и окислительного стресса. Не удивительно, что легочные клетки принимают ту же самую геномную защитную программу, что и клетки кожи, которые подвергаются тем же самым воздействиям. Параллельно усложнению цитоскелета, программа предшественников базальных клеток приобретает $il+$ клетками позднее в эмбриональной жизни, и является VEGF¹⁶⁴⁻¹⁸⁸-зависимой.

Мы продемонстрировали, что понижающая регуляция семейства FAM25 и понижающая регуляция экспрессии гена *C9orf169* снижает экспрессию KRT14. Далее, мы знаем, что экспрессия семейства FAM25 (человеческого R2R¹ гомолога) и *C9orf169* (человеческого R2R² гомолога) подвергается повышающей регуляции VEGFA/ VEGF¹⁶⁵. Как эти гены действуют в VEGFA/ VEGF¹⁶⁵ пути? миРНК-опосредованный нокдаун R2R гомологов можно применять для исследования специфической роли R2R гомологов в этом пути. Действительно, роль R2R гомологов состоит в модуляции VEGFA/ VEGF¹⁶⁵ ответа в клетке. Базальная экспрессия изоформ VEGFA и VEGF¹⁶⁵ является высокой в легочном эпителии. Эпителиальные функции и структуры являются гораздо более сложными, чем их эндотелиальные аналоги. Таким образом, типичные VEGFA/ VEGF¹⁶⁵ эффекты роста и умножения в эндотелии должны быть более усложненными в эндотелии. Как это реализуется? Экспрессия R2R гомологов ведет к спонтанной модуляции передачи сигналов HTF1A (обеспечивая толерантность к кислороду), и модуляции специфического (PERP) антиапоптотического пути. Это обеспечивает (ре)генерацию прочных эпителиальных клеток (с основным защитным барьером против стресса), без установки неограниченного ростового потенциала. Другими словами, модуляция специфического антиапоптотического пути не позволяет развить общую толерантность к апоптозу. Общая толерантность к апоптозу может привести к опасной ситуации иммортализации клетки -клетка становится раковой клеткой.

Данное исследование пролило свет на некоторые заболевания легких человека. У недоношенных новорожденных позднее эмбриональное развитие легких нарушается при преждевременном рождении ребенка. Недостаточные уровни сурфактантного белка в легочных альвеолах ведут к тяжелому респираторному дистрессу в большой группе недоношенных новорожденных. Инсталляция сурфактанта в легкие новорожденного нацелена на профилактику и лечение дыхательной недостаточности у недоношенных новорожденных. Однако высокий уровень кислорода и стресс из-за напряжения при механической вентиляции ведет к хроническому повреждению легких или бронхолегочной дисплазии (БЛД). Ускорение плоскоклеточной дифференцировки в дистальных воздухоносных путях недоношенных новорожденных может предотвратить это истощающее состояние. Сеть промежуточных филаментов и синхронизированное восполнение пула базальных клеток могут также иметь первостепенное значение в поиске лечения некоторых заболеваний легких у взрослых. Приобретение плоскоклеточного фенотипа с экспрессией некоторых EDC кластеров генов характеризует плоскоклеточную метаплазию в воздухоносных путях взрослых с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Этот механизм защиты от вредоносного стимула, однако, сопровождается потерей регенерирующих базальных клеток³². Напротив, эмбрион следует при развитии программе плоскоклеточной дифференцировки при одновременном построении резервуара базальных клеток с хорошо определенной картой. Эта карта служит в качестве руководства для фармакологического вмешательства в механизм транскрипции для промежуточных филаментов или базальных клеток. Она также указывает на трансформированные $il+$ клетки как на источник эпителиальных клеток легких.

Функциональные характеристики R2R¹ и R2R²

VEGF-A (мышьяная изоформа VEGF¹⁶⁴ = изоформа VEGF¹⁶⁵) зависимая экспрессия группы генов промежуточных филаментов была подтверждена на мышьяных эмбрионах. Экспрессия этих генов промежуточных филаментов ведет к дифференцировке легочных эпителиальных клеток и развитию программы базальных клеток в легочных мезенхимальных клетках.

Далее, VEGF-A (мышьяная изоформа VEGF¹⁶⁴ = изоформа VEGF¹⁶⁵) зависимая экспрессия генов промежуточных филаментов также была подтверждена первичных эпителиальных клетках взрослых людей. Стимуляция этих клеток VEGF-A изоформой VEGF¹⁶⁵ ведет к повышающей регуляции экспрессии гена промежуточных филаментов. Экспрессия гена промежуточных филаментов в этих клетках подвергается понижающей регуляции посредством миРНК, специфических в отношении изоформы VEGF¹⁶⁵. В итоге, экспрессия генов промежуточных филаментов служит парадигмой дифференцировки и регенерации воздухоносных путей. R2R¹ и R2R² играют специфическую роль в этой программе экспрессии.

R2R¹

Экспрессия R2R¹ является VEGF-A (мышьяная изоформа VEGF¹⁶⁴ = человеческая изоформа VEGF¹⁶⁵)-зависимой у мышей. Мезенхимальные клетки легких (клетки с позитивным GS-IB4 окрашиванием) приобретают программу экспрессии генов базальных эпителиальных клеток. Экспрессия R2R¹ является необходимой для мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП).

Роль R2R¹ в МЭП была подтверждена в иной эмбриональной ткани, чем легкие -завершение меж-

желудочковой перегородки в сердце совершалось с помощью МЭП. У мышей R2R¹ высоко экспрессируется при развитии межжелудочковой перегородки, и является VEGF-A (мышинная изоформа VEGF¹⁶⁴ = человеческая изоформа VEGF¹⁶⁵)-зависимым. Напротив, экспрессия R2R¹ не установлена при развитии выводного тракта правого желудочка: развитие этой структуры, как известно, является МЭП-независимым (см. фиг. 12).

R2R¹ является геном-кандидатом у мыши и человека для мезенхимально-эпителиального перехода - экспрессия этого гена преобразует VEGF-A (мышинная изоформа VEGF¹⁶⁴ = человеческая изоформа VEGF¹⁶⁵)-эффект на МЭП. Обратным процессом для МЭП является ЭМП (эпителиально-мезенхимальный переход). ЭМП является важной частью прогрессирования и метастазирования рака. Таким образом, R2R¹ может играть важную роль в биологии и терапии рака.

Далее, анализ *in silico* установил, что белковый продукт R2R¹, вероятно, взаимодействует с рибосомой. Помимо научного значения, взаимодействие R2R¹ белковой структуры с рибосомой можно применять для разработки лекарств в области биологии рака и МЭП.

R2R²

Было установлено, что R2R² высоко экспрессируется в первичных легочных эпителиальных клетках взрослого человека. Было установлено, что экспрессия R2R¹ *in vitro* подвергается повышающей регуляции со временем, и является VEGF-A (изоформа VEGF¹⁶⁵)-зависимой. Белковый продукт R2R² является важным для нормальной дифференцировки и поддержки легочного эпителия у взрослых (см. фиг. 13).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение полинуклеотида, содержащего регенеративный ген для респираторных клеток R2R¹ или R2R² (R2R^{1/2}) либо оба гена, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний и
- (c) рака;

где гены R2R имеют последовательности, идентичные по меньшей мере на 70% последовательностям, выбранным из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11.

2. Применение белка, кодируемого геном R2R^{1/2}, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний и
- (c) рака;

где белок, кодируемый геном R2R, имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 6, 9 и 12.

3. Применение антисмыслового олигонуклеотида, способного модулировать экспрессию гена R2R^{1/2}, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний и
- (c) рака,

где ген R2R имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные к связыванию с белком, кодируемым геном R2R^{1/2} и имеющим последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 6, 9 и 12, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний и
- (c) рака.

5. Способ диагностики одного или нескольких заболеваний и/или состояний, выбранных из:

- (a) сердечных заболеваний и/или состояний;
- (b) легочных заболеваний и/или состояний;
- (c) рака и
- (d) предрасположенности к любому из (a)-(c);

где указанный способ включает выявление уровня экспрессии гена R2R^{1/2} в образце, полученном от исследуемого субъекта, причем выявление aberrантного уровня гена R2R в образце является показателем одного или нескольких указанных выше заболеваний и/или состояний и/или предрасположенности к ним, где ген R2R имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11, где aberrантным уровнем является уровень, повышенный или сниженный по сравнению с уровнем экспрессии в образце, полученном от субъекта, не страдающего указанными выше заболеваниями и/или состояниями.

6. Способ по п.5, где выявление уровня экспрессии гена R2R^{1/2} включает гибридизацию в жестких

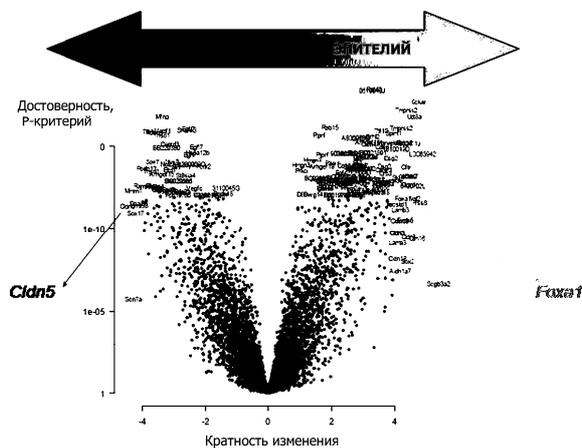
условиях олигонуклеотидного зонда и/или праймера со всей или частью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11.

7. Способ тестирования соединения на способность модулировать экспрессию гена R2R^{1/2}, включающий обеспечение контакта гена R2R с тестируемым соединением и детекцию модуляции экспрессии гена R2R, имеющего последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11, причем детекция модуляции заключается в определении того, является ли уровень экспрессии гена R2R таким же, меньшим или большим, чем уровень экспрессии, детектированный в отсутствие тестируемого соединения, и если уровень меньше или больше, то тестируемое соединение может быть пригодным в качестве модулятора экспрессии гена R2R, а также пригодным для лечения заболеваний и/или состояний, указанных в п.1.

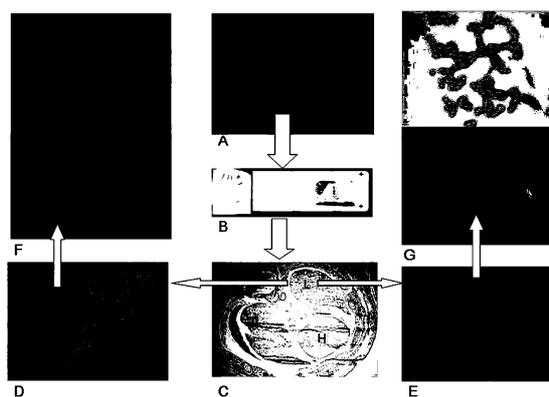
8. Фармацевтическая композиция, включающая ген R2R, имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11, а также фармацевтически пригодный наполнитель, носитель или разбавитель, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, указанных в п.1.

9. Фармацевтическая композиция, включающая белок, кодируемый геном R2R и имеющий последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, 6, 9 и 12, а также фармацевтически пригодный наполнитель, носитель или разбавитель, для лечения одного или нескольких заболеваний и/или состояний, указанных в п.1.

10. Животная модель для исследования сердечного и/или легочного заболевания, или состояния, или рака, где животную модель получают путем модуляции или нарушения гена R2R, который имеет последовательность, идентичную по меньшей мере на 70% последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 и 11.

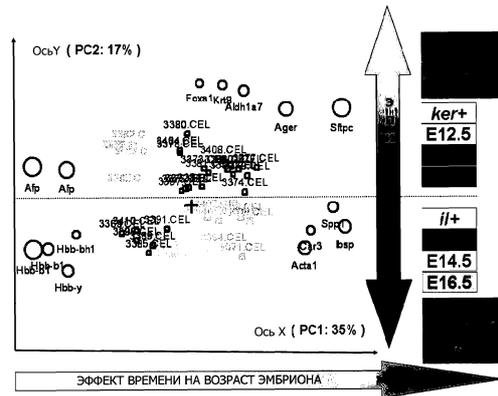


Фиг. 1

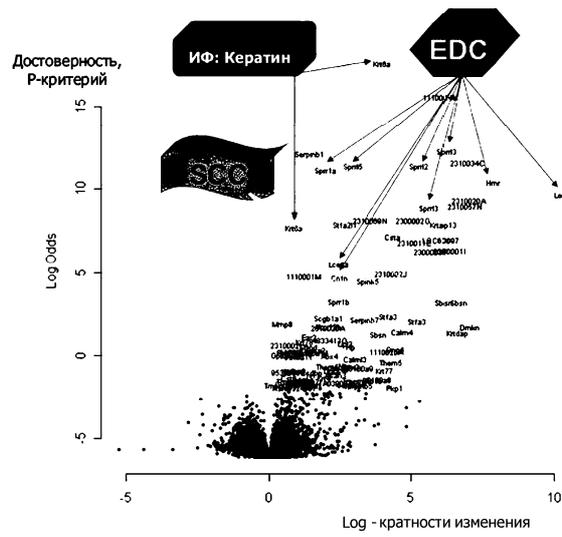


Фиг. 2

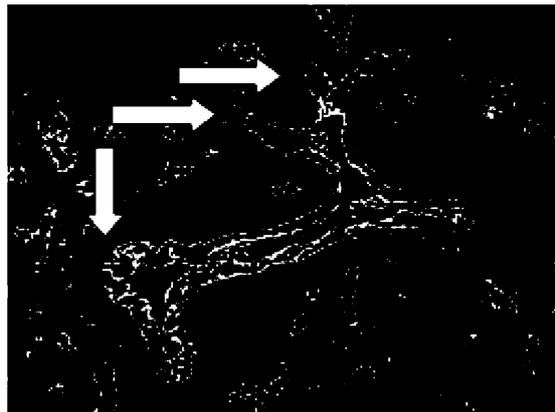
034088



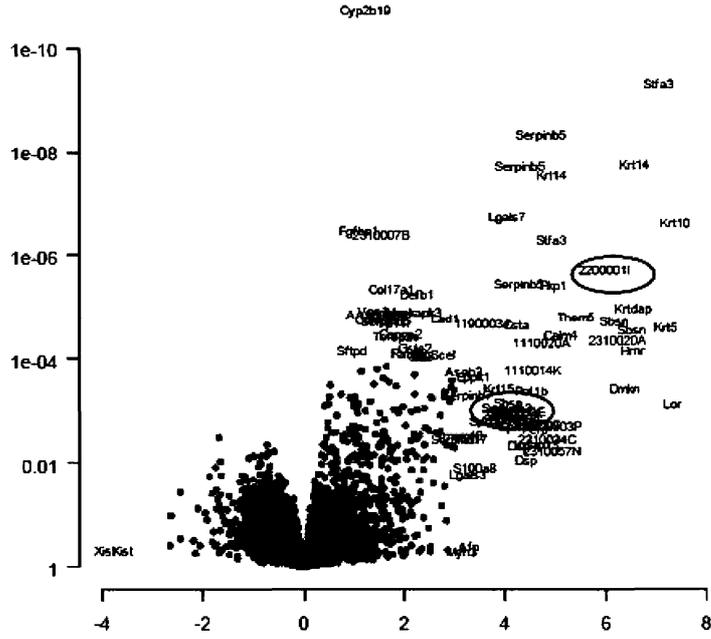
Фиг. 3



Фиг. 4А



Фиг. 4В



Фиг. 7

hR4RA_ENST00000343959	(1)	1	10	20	30	41
R4Ra_pDONR201	(1)	-----				
Консенсус	(1)	ACACTGACACGGACCSAAGGAGTGGAAAAGCTTTACCTGT				
		Часть 2				
hR4RA_ENST00000343959	(42)	42	50	60	70	82
R4Ra_pDONR201	(42)	-ACTGTCTGCTGCCACACGATGCTGGGAGGCCTGGGGAAGC				
Консенсус	(42)	CACTGTCTGCTGCCATACGATGCTGGGAGGCCTGGGGAAGC				
		Часть 3				
hR4RA_ENST00000343959	(83)	83	90	100	110	123
R4Ra_pDONR201	(83)	TGGCTGCCGAAAGCCTGGCCACCGCACCAGAGAAAGCCACC				
Консенсус	(83)	TGGCGGCCGAGGGCCCTGGCCACCGCACAGAGAAAGCCACT				
		Часть 4				
hR4RA_ENST00000343959	(124)	124	130	140	150	164
R4Ra_pDONR201	(124)	GAGGGAGCCATTTCATCCCGTGGAAAGTGGTGAAGGAGGT				
Консенсус	(124)	GGGGGAGCAGTTCAACAGTGGAAAGAGGTGGTGAAGGAGGT				
		Часть 5				
hR4RA_ENST00000343959	(165)	165	170	180	190	205
R4Ra_pDONR201	(165)	GGTGGGACACGCCAAAGGAGACTGGAGAGAAAGCCATTGCTG				
Консенсус	(165)	GGTGGGCCACGCCAAAGGAGTTGGAGAGAAAGCCATTAAATG				
		Часть 6				
hR4RA_ENST00000343959	(206)	206	220	230	246	
R4Ra_pDONR201	(206)	AAGCCATAAAGAAAGCCAAAGATCAGGGGACAAAAGATG				
Консенсус	(206)	ACGCCATAAAGAAAGCCAAAGATCAGGAGACAGGGTGGTG				
		Часть 7				
hR4RA_ENST00000343959	(247)	247	260	270	287	
R4Ra_pDONR201	(247)	AAGGAAATCACTGAGACAGTGACCAACACAGTCACAAATGC				
Консенсус	(247)	AAGGAGGTCACTGAGAAGGTACCCACACCATCACTGATGC				
		Часть 8				
hR4RA_ENST00000343959	(288)	288	300	310	328	
R4Ra_pDONR201	(288)	CATCACCCATGCGAGCAGAGTCTGGACAAACTTGGACAGT				
Консенсус	(288)	TGTTACCCATGCGGCAGAAAGCCCTGGGAAGACTGGGACAGT				
		Часть 9				
hR4RA_ENST00000343959	(329)	329	340	350	369	
R4Ra_pDONR201	(329)	GAGTGCACCTGTACACGGC-----CCTTCCCAGTCTCAA				
Консенсус	(329)	GAGCCTGCCTACAGCATGGCTGGCCCTTCCCTGAAGGTCAA				
		GAG C C T C A C A G G C C C T T C C A T C A A				

Фиг. 8

		(1)	1	10	20	34	Часть 1
Транслированный hR4Ra	ENST00000343959	(1)	MLGGIGKLAABGLAHRGKATGGAIVAVEVVKE				
Транслированный R4Ra_pDONR20	(1)	MLGGIGKLAABGLAHRGKATGGAVNAVEVVSE					
Консенсус	(1)	MLGGIGKLAABGLAHRGKATGAINAVEVVV					Часть 2
		(35)	35	40	50	68	Часть 2
Транслированный hR4Ra	ENST00000343959	(35)	VVGHAKETGEKAIABAKKAQESGDKKMKEITET				
Транслированный R4Ra_pDONR20	(35)	VVGHAKEVGEKTINDALKKAQESGDRVVKVETEK					
Консенсус	(35)	VVGHAKEGEKIDAKKAQESGDKMKEITE					Часть 3
		(69)	69	80	90		
Транслированный hR4Ra	ENST00000343959	(69)	VTNTVTNAITHAAESLDKLGQ-				
Транслированный R4Ra_pDONR20	(69)	VTHTITDAVTHAAEGLGRIGQ-					
Консенсус	(69)	VTTITAITHAAEIKLGQ					

Фиг. 9

		(370)	370	380	390	400	410	Часть 10
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(370)	CCCTCAGAGCCCAAGCCCTGGGCTGCCACCCACTGAGGACC					
R4Rd_2310002J15Rik	(1)							
Консенсус	(370)							
		(411)	411	420	430	440	451	Часть 11
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(411)	AGGGCTGGGCCAGCTGTCTGCTCCAAGTGTGGGCTCT					
R4Rd_2310002J15Rik	(1)		----GTACTGGCTGTCTCTAAGTTGTGAGGCCCT					
Консенсус	(411)		GCGCTGTCTCTAGTTGTGGCTCT					
		(452)	452	460	470	480	492	Часть 12
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(452)	TGGGATCTTGGG---AACCCCAT-CTCT-GAGCCG----					
R4Rd_2310002J15Rik	(36)		TGGGATCTTGGGCTMACMCCTGTCTATAGWACTCCGATA					
Консенсус	(452)		TGGGATCTGGACCTCTGTGGCC					
		(493)	493	500	510	520	533	Часть 13
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(483)	-----GCCCA-TGGCCCGCCCTCCCAAGGAGGA					
R4Rd_2310002J15Rik	(77)		GCTCCCRMGCTCCAGTGSAMCCTGGKCGNGNAGGGA					
Консенсус	(493)		GCCCAAGGAGGACGCG					
		(534)	534	540	550	560	574	Часть 14
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(514)	AAAAGGCTGCCAGTCTCAACTCAG--GCACTGGGACC					
R4Rd_2310002J15Rik	(118)		AAAAGCACTTGTGGTGTCTGTCAACCCGCACTGGGACC					
Консенсус	(534)		AAAAGGCTGTGTCTCAAGGACC					
		(575)	575	580	590	600	615	Часть 15
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(553)	TAGAGCTCAGAAAGCGAGAGGACAGACTGCCGTGTGCA					
R4Rd_2310002J15Rik	(159)		TGGAGCTG-GAGGACTAAGAAAGACAGCGC--TGCTGCT					
Консенсус	(575)		TGAGCTGAGACAGACAGCGCTGTG					
		(616)	616	630	640	656	666	Часть 16
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(594)	-CCACAGCTGGACCATGGACCCCAAGAGATGGCTCAAA					
R4Rd_2310002J15Rik	(197)		GCCACAGCTGGACCATGGACCCCAAGAGATGGCTCAAA					
Консенсус	(616)		CCACAGCTGGACCATGGACCCCAAGAGATGGCTCAAA					
		(657)	657	670	680	697	697	Часть 17
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(634)	GAAACCCATATGCCACATCAGCATCCCGGGCTCACCTGC					
R4Rd_2310002J15Rik	(238)		GAAATCCATATGCCACATCAGCATCCCGGGCTCACCTGC					
Консенсус	(657)		GAAACCCATATGCCACATCAGCATCCCGGGCTCACCTGC					
		(698)	698	710	720	738	738	Часть 18
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(675)	GGCCTGACCTGGGGCAGCAGTATAGAGGTGGCTTCCACCTGT					
R4Rd_2310002J15Rik	(279)		GCTCTGACCTGGGGCAGCAGTATAGAGAGGTCTCTCTCA					
Консенсус	(698)		GCTGACCTGGGGCAGCAGTATAGAGGTCTCTCTCA					

Фиг. 10

		(739)	739	750	760	779	779	Часть 19
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(716)	TCCTCATCTCGGAGATGCAGCCCTGCCAGTGGGGCTCG					
R4Rd_2310002J15Rik	(320)		TCCTCATCTCGGAGATGCAGCCCTGCCAGTGGGGCTCG					
Консенсус	(739)		TCCTCATCTCGGAGATGCAGCCCTGCCAGTGGGGCTCG					
		(780)	780	790	800	810	820	Часть 20
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(757)	TGCCCCAGAGCCAAACCACTCTTGCAGCCGACCGAGGTC					
R4Rd_2310002J15Rik	(361)		TATCCAGAGCCAGTGGGCTCTTACAACTACTGAAAGCC					
Консенсус	(780)		TGCCCCAGAGCCAAACCACTCTTGCAGCCGACCGAGGTC					
		(821)	821	830	840	850	861	Часть 21
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(798)	CAGGGCCAAAGGGCCCAAGGGTAACAGGGGGCTGCCCC					
R4Rd_2310002J15Rik	(402)		CTGGGCCAAAGGGTATCAAGGGATCAAGGGTACTGCTCT					
Консенсус	(821)		CAGGGCCAAAGGGTATCAAGGGATCAAGGGTACTGCTCT					
		(862)	862	870	880	890	902	Часть 22
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(839)	ATCCAGAACAGCAGGCTGGCAGCAGCTGGCAACCCCTA					
R4Rd_2310002J15Rik	(443)		GAGCAGGGCCAGCAGCTGGCAGCAGCTGGCAACCCCTA					
Консенсус	(862)		ATCCAGAACAGCAGGCTGGCAGCAGCTGGCAACCCCTA					
		(903)	903	910	920	930	943	Часть 23
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(880)	CAGCAGCAGTCAAGCCAGGCGGACTGACTACGCTGGCC					
R4Rd_2310002J15Rik	(484)		TAGCAGTGGGCAACCTCCATCGGACTGACTATGCTGGCC					
Консенсус	(903)		CAGCAGCAGTCAAGCCAGGCGGACTGACTACGCTGGCC					
		(944)	944	950	960	970	984	Часть 24
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(921)	CTCCGCCGCGGGGGCGGGGATGACATCGCCCAACCACTGC					
R4Rd_2310002J15Rik	(525)		TGCCACTGTAGGGCGTGGTATGACATCGCCCAACCACTGC					
Консенсус	(944)		CTCCGCCGCGGGGGCGGGGATGACATCGCCCAACCACTGC					
		(985)	985	990	1000	1010	1025	Часть 25
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(962)	TGCTGCTGCCCTGTGCTGCCACTGCTGCCACTGCCCTCT					
R4Rd_2310002J15Rik	(566)		TGCTGCTGCCCTGTGCTGCCACTGCTGCCACTGCCCTCT					
Консенсус	(985)		TGCTGCTGCCCTGTGCTGCCACTGCTGCCACTGCCCTCT					
		(1026)	1026	1040	1050	1066	1066	Часть 26
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(1003)	CTGCCCTGTGTCACAGCTGTT-----GTGTATCTCCTAGC					
R4Rd_2310002J15Rik	(607)		CTGCCCTGTGTCACAGCTGTT-----GTGTATCTCCTAGC					
Консенсус	(1026)		CTGCCCTGTGTCACAGCTGTTGTGTATCTCCTAGC					
		(1067)	1067	1080	1090	1107	1107	Часть 27
Контиг hR4Rd	ENST00000359069	(1044)	CCAGCCACCTGCCAGGGCCAGGACCCAGACTTCAGCAAA					
R4Rd_2310002J15Rik	(642)		-----TACTATTAACCTCCAGGGCTGTG----CAGCCAA					
Консенсус	(1067)		CCAGCCACCTGCCAGGGCCAGGACCCAGACTTCAGCAAA					

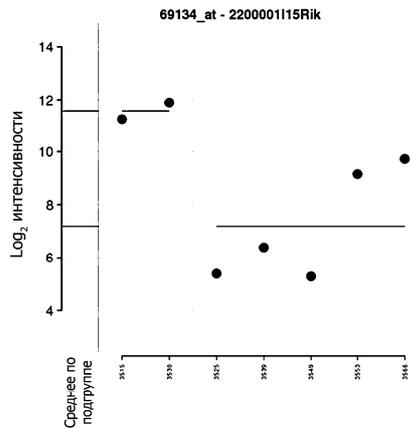
Фиг. 10 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

		Часть 28			
	(1108)	1108	1120	1130	1148
Континг	hR4Rd_ENST00000359069	(1065)	TGTGGCTCACACAGTGC	CGGGACATGCCGGGACATGCCGGG	
R4Rd_2310002J15Rik	(674)	GGTTCCTG-CTCAATGCCAAAGTGT	TGCTGGACATCAGGAG		
Консенсус	(1108)	GT CT C CA TGCC	T C GGACAT	GG G	
		Часть 29			
	(1149)	1149	1160	1170	1189
Континг	hR4Rd_ENST00000359069	(1126)	TGGCTGTTGTTCATGGCGTCTG	CCCTTCACACCAGGCACT	
R4Rd_2310002J15Rik	(714)	CAGCCGTGTTCATGAGCATCAGCCAT	TTCTGCTGCCCTGAGCA		
Консенсус	(1149)	GC GTTGTTCATG GC TC GCC TTC CC G C			
		Часть 30			
	(1190)	1190	1200	1210	1220
Континг	hR4Rd_ENST00000359069	(1167)	GGGGCTCAGACCCACAGGAAGGTGG	CCGTTTCAGCCCGAGC	
R4Rd_2310002J15Rik	(755)	GGGGAGCCTGTCCACCAAG-----	CGTTCAGCTGTAGC		
Консенсус	(1190)	GGGG C CCACCAAG	CGTTCAGC	AGC	
		Часть 31			
	(1231)	1231	1240	1250	1260
Континг	hR4Rd_ENST00000359069	(1208)	-TCCTGAAACGGAAATCCAGGTCCTGGC	-----TGG-----	
R4Rd_2310002J15Rik	(787)	CTTCTGGAATAGGGTTCAGCCACTAG	CCATGTGTGGCAACA		
Консенсус	(1231)	T CTG AA G T CCAG CT GC	TGG		
		Часть 32			
	(1272)	1272	1280	1290	1300
Континг	hR4Rd_ENST00000359069	(1238)	AGAAGGACACCCCTGATTACCTT-AAGG	CCCAGGCAATAAAA	
R4Rd_2310002J15Rik	(828)	ACAAGGACACCCCTCACGTCCTGCAAG	ACTTTGGCAATAAAA		
Консенсус	(1272)	A AAGGACACCC T A CCT AAG C	GGCAATAAAA		
		Часть 33			
	(1313)	1313	1320	1330	1340
Континг	hR4Rd_ENST00000359069	(1278)	GCAGGGTGATCTTC-----		
R4Rd_2310002J15Rik	(869)	GCAAGATGAGCGCTGNNCCTGNTGAAA	AAAAAMMAAAA		
Консенсус	(1313)	GCAAG TGA C T			

Фиг. 10 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

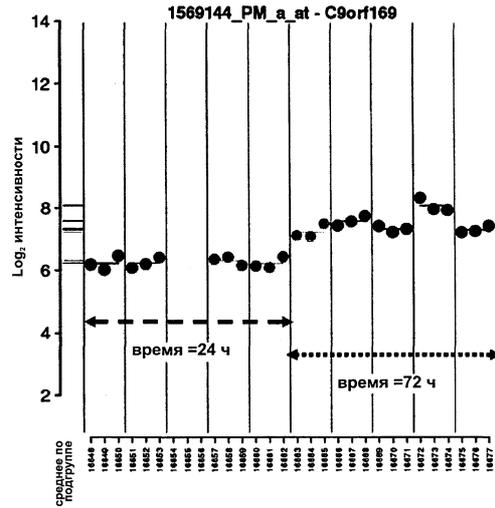
		Часть 1			
	(1)	1	10	20	33
Транслированный	hR4Rd_ENST00000359069	(1)	MAPPLPRREKAAASRSTQALGFPRAKTE	RTDPCR	
Транслированный котинг	R4Rd_2310002J15Rik	(1)	-----		
Консенсус	(1)				
		Часть 2			
	(34)	34	40	50	66
Транслированный	hR4Rd_ENST00000359069	(34)	VATTGWTMDPQEMVVKNFYAHISIPRAHLR	PD	
Транслированный котинг	R4Rd_2310002J15Rik	(1)	-----MDPHEMVVKNFYAHISIPRAHLR	DL	
Консенсус	(34)	MDP EMVVKNFYAHISIPRAHLR	DL		
		Часть 3			
	(67)	67	80	99	
Транслированный	hR4Rd_ENST00000359069	(67)	GQQLLEVAETCSSSSEMQPLFVGP	CAPEPTHLLQ	
Транслированный котинг	R4Rd_2310002J15Rik	(27)	GQQLLEVPSSSSSEMQPLFVGP	CAPEPTHLLQ	
Консенсус	(67)	GQQLLE S SSSSE QPLP G C PEP LLQ			
		Часть 4			
	(100)	100	110	120	132
Транслированный	hR4Rd_ENST00000359069	(100)	PTEVPGPRGAKGNQGAAPIONQQA	WQPFQNFYS	
Транслированный котинг	R4Rd_2310002J15Rik	(60)	TTEAPGPRGKIKGKTAREHGQQTW	QSECFNFYS	
Консенсус	(100)	TE PGRKG KG G AP QQ WQ P NFYS			
		Часть 5			
	(133)	133	140	150	165
Транслированный	hR4Rd_ENST00000359069	(133)	SSQRQAGLTYAGPPFAGRGDDIA	HNHCCCPCCN	
Транслированный котинг	R4Rd_2310002J15Rik	(93)	SGQRFSGLTYAGLFPVGRGDDIA	HNHCCCPCCS	
Консенсус	(133)	S QR AGLTYAG PP GRGDDIA	HNHCCCPCC		
		Часть 6			
	(166)	166	184		
Транслированный	hR4Rd_ENST00000359069	(166)	CSHCPRFRCRHSCCCVIS		
Транслированный котинг	R4Rd_2310002J15Rik	(126)	CSHCPRFRCRHSCCCVIS--		
Консенсус	(166)	CSHCPRFRCRHS			

Фиг. 11



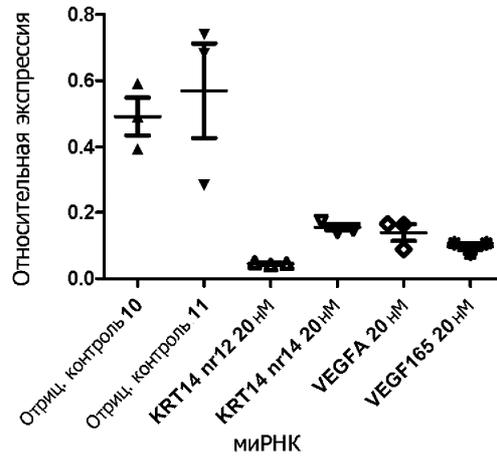
VEGF-A (VEGF¹⁶⁴) – зависимая повышающая регуляция R2R¹ при развитии межжелудочковой перегородки мышиного эмбриона. Красный – дикий тип, синий – VEGF^{120/120} нокаутной мыши, не имеющей VEGF¹⁶⁴ изоформы

Фиг. 12



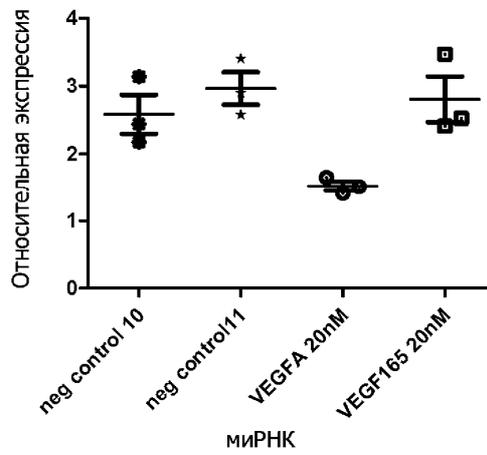
Фиг. 13

Относительная экспрессия KRT14
(PGK1 - нормализованная)



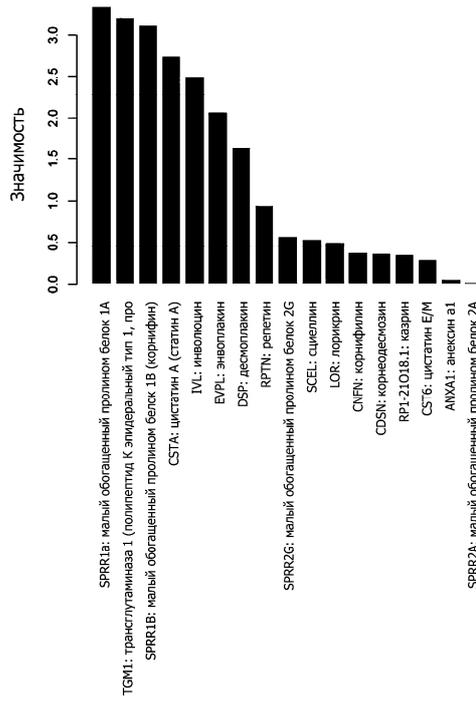
Фиг. 14А

Относительная VEGFA (всех изоформ)
(PGK1 - нормализованная)



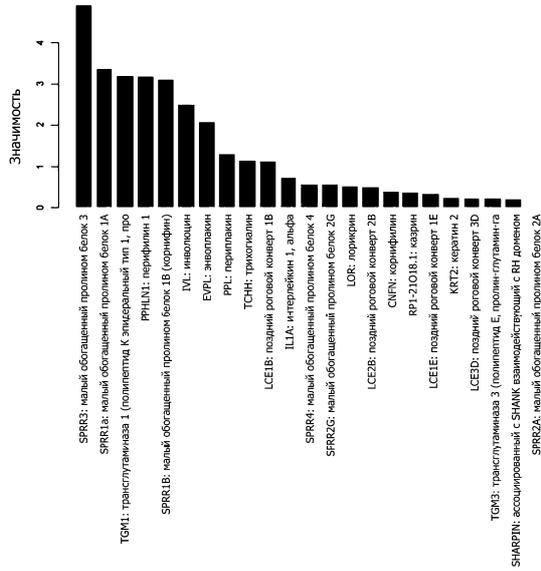
Фиг. 14В

Значение исследуемых генов, вовлеченных в генный набор GO:0001533:9606

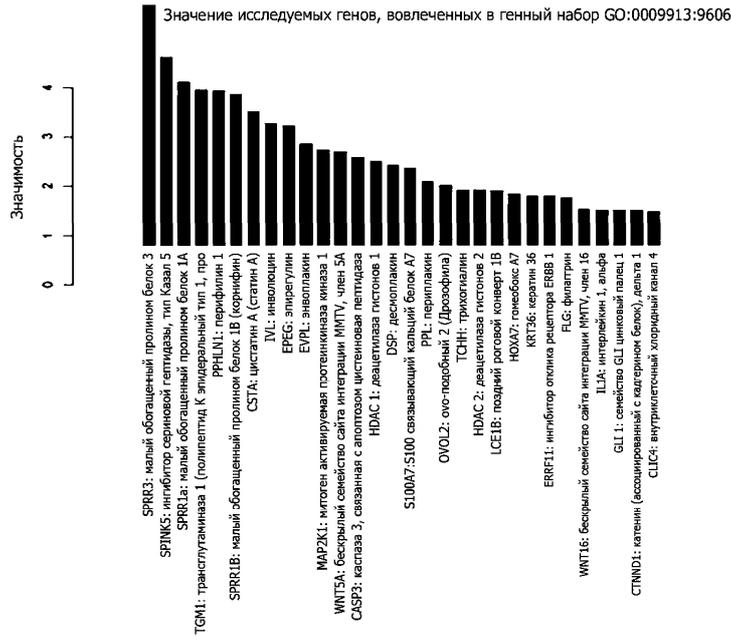


Фиг. 15В

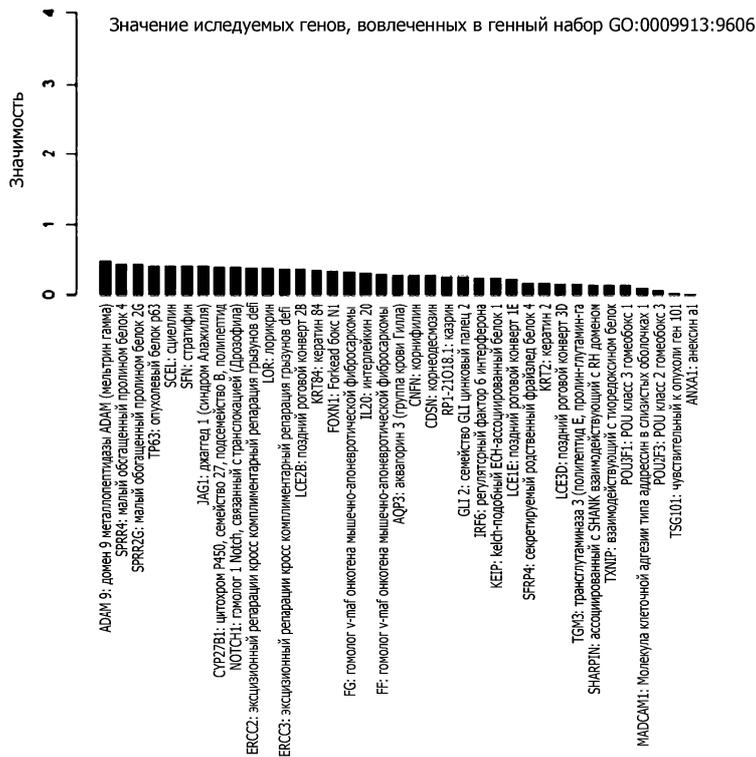
Значение исследуемых генов, вовлеченных в генный набор GO:0031424:9606



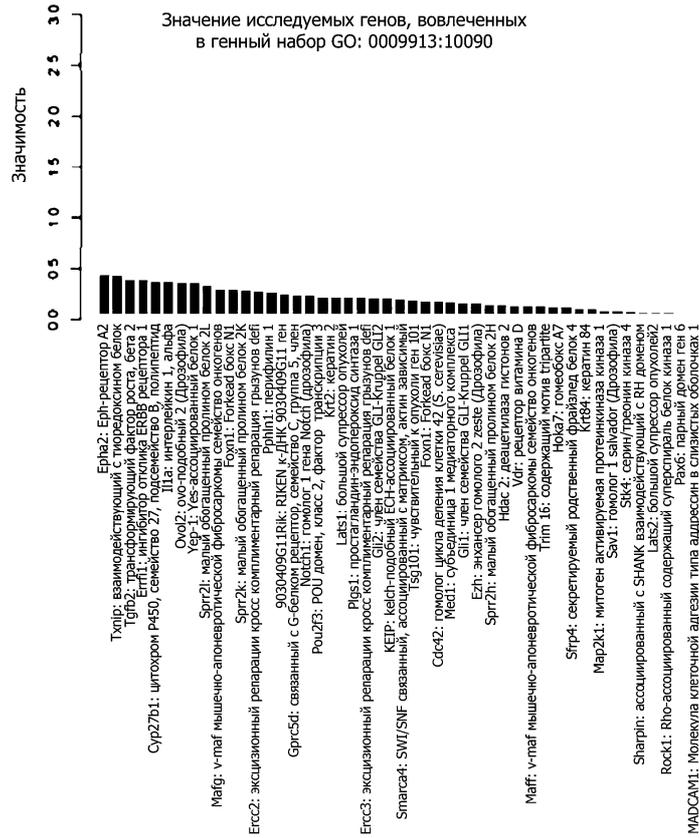
Фиг. 15С



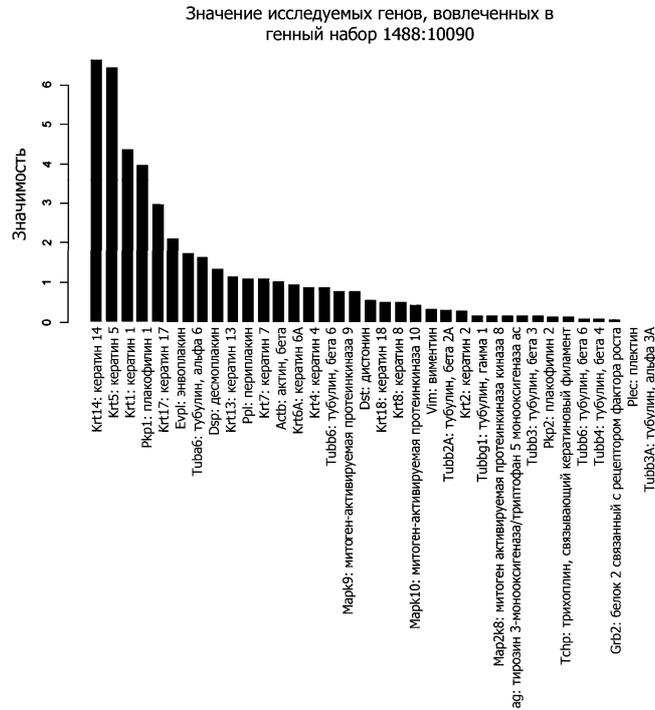
Фиг. 15D



Фиг. 15D (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

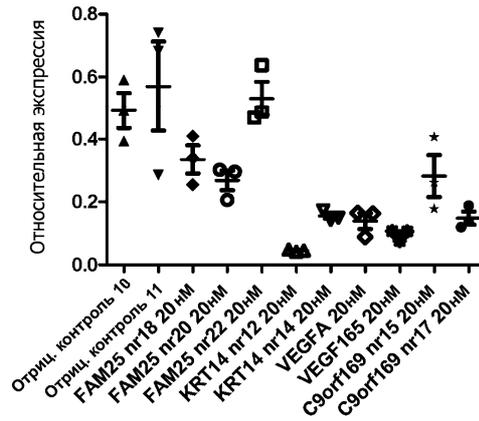


Фиг. 15H (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



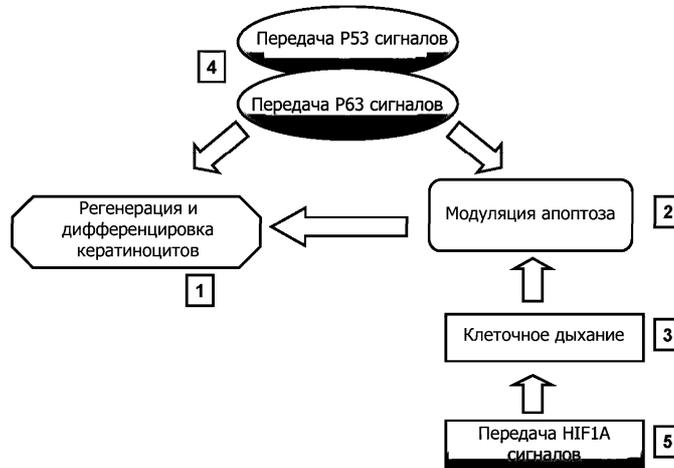
Фиг. 15I

Относительная экспрессия KRT14
(PGK1 - нормализованная)

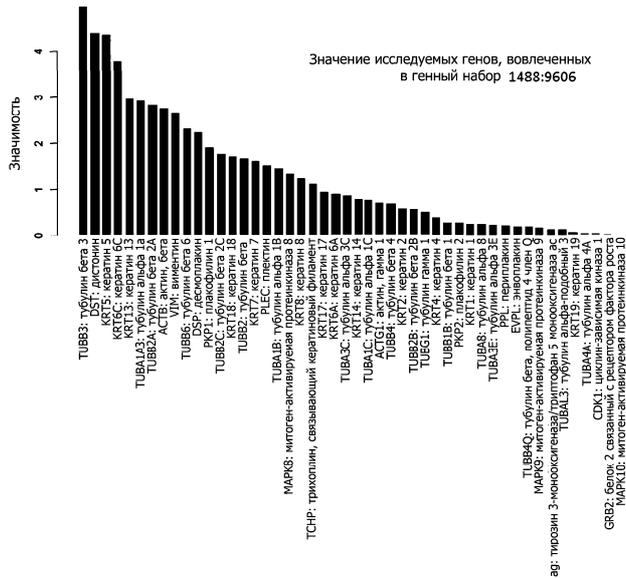


миРНК

Фиг. 16С

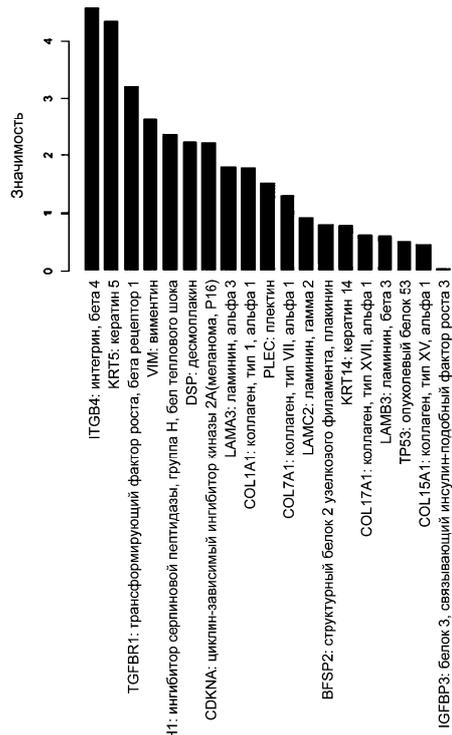


Фиг. 17

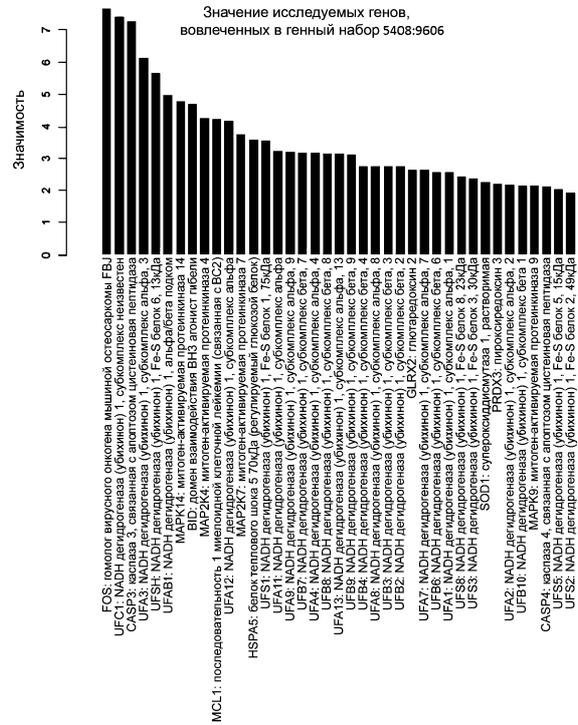


Фиг. 18А

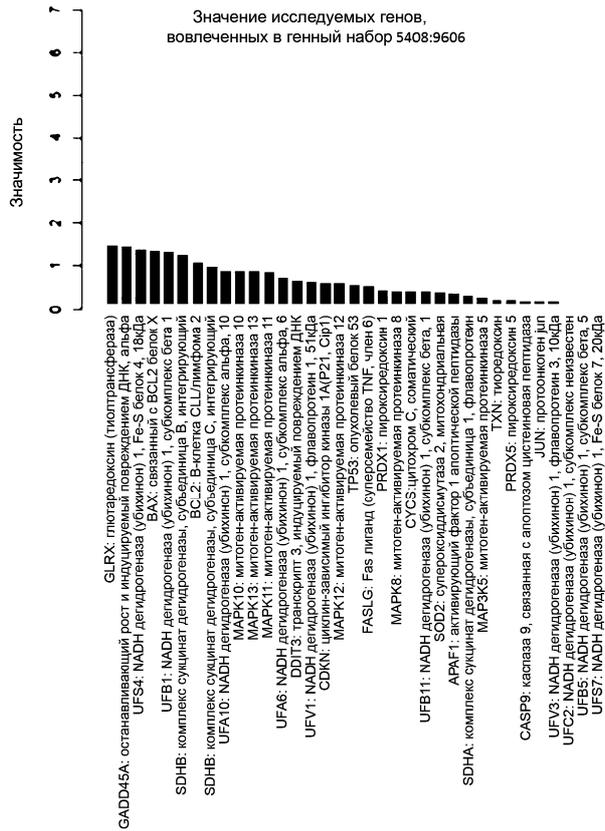
Значение исследуемых генов, вовлеченных в генный набор 1110667637:9606



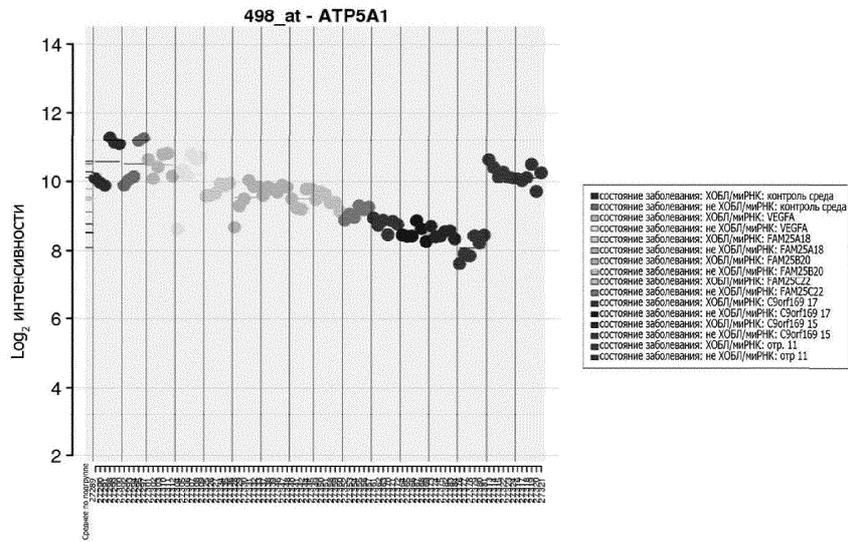
Фиг. 18В



Фиг. 18С

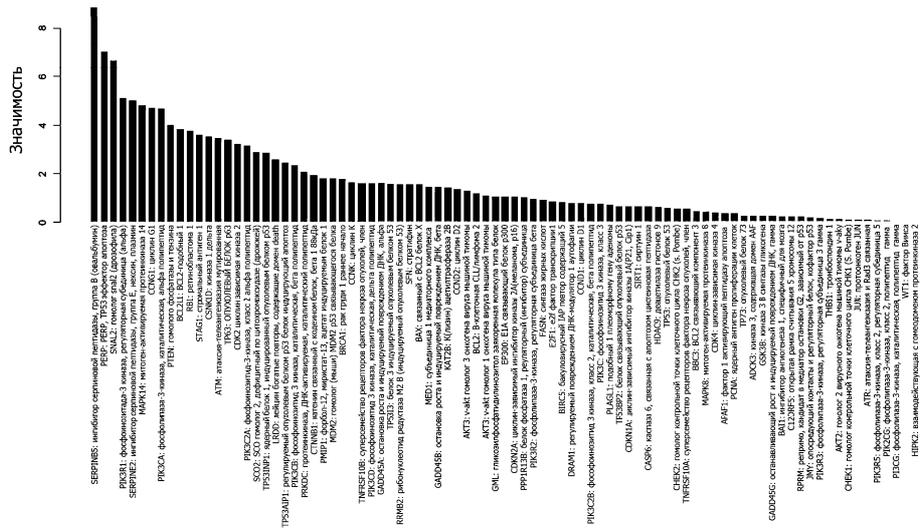


Фиг. 18С (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



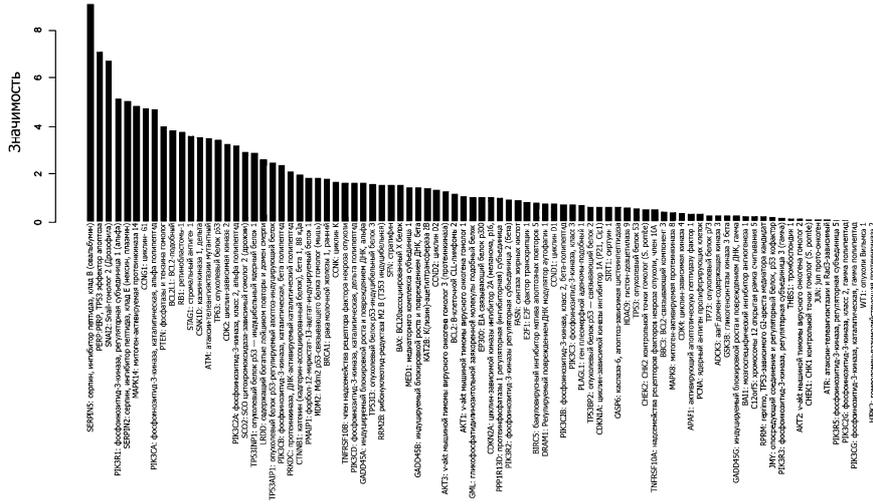
Фиг. 19А

Значение исследуемых генов, вовлеченных в генный набор ING:1es4i:9606



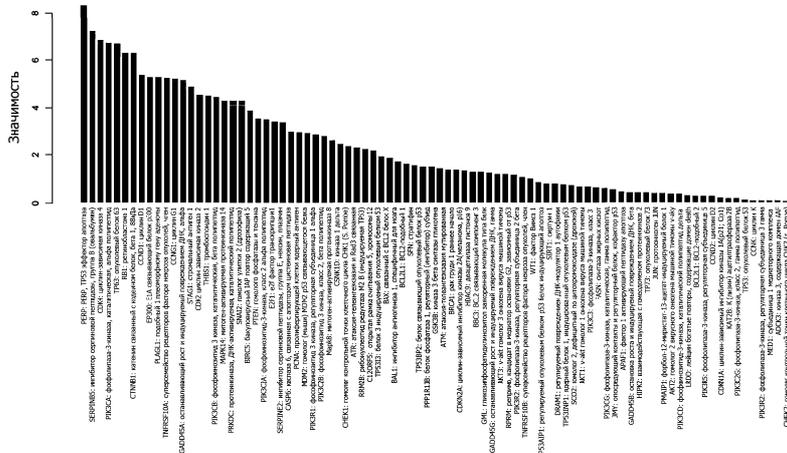
Фиг. 21

Значение исследуемых генов, вовлеченных в генный набор ING:1es4i:9606

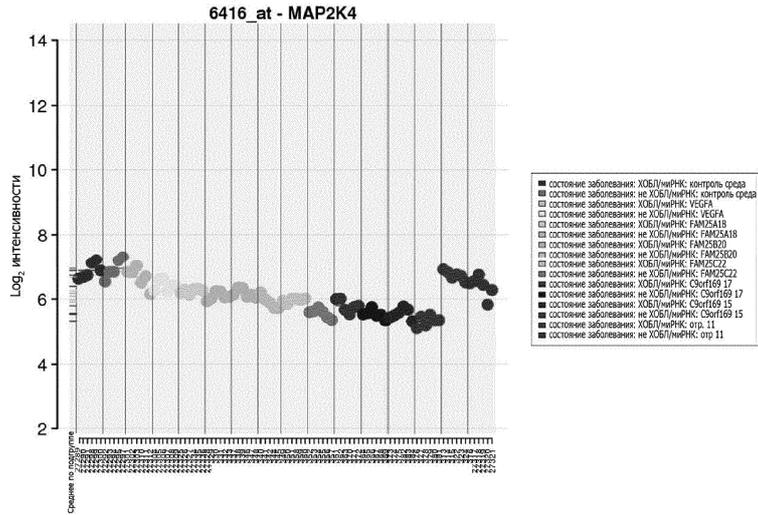


Фиг. 22

Значение исследуемых генов, вовлеченных в генный набор ING:1es4i:9606



Фиг. 23



Фиг. 25С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2