# СОДЕРЖАНИЕ

# Том 55, номер 4, 2021

#### ОБЗОРЫ

SCР-фосфатазы и онкогенез	
Г. А. Пузанов, В. С. Сенченко	531
Основные подходы к контролируемой деградации белков в клетке	
М. А. Капитонова, О. А. Шадрина, С. П. Королев, М. Б. Готтих	543
Применение олигонуклеотидов, полученных с помощью микрочиповых синтезаторов ДНК, для синтеза генетических конструкций	
А. Н. Синяков, В. А. Рябинин, Е. В. Костина	562
Экспрессия рецептора грелина GHS-R1a в головном мозге (мини-обзор)	
М. И. Айрапетов, С. О. Ереско, А. А. Лебедев, Е. Р. Бычков, П. Д. Шабанов	578
Модификация белка шипа для вакцин против оболочечных РНК-вирусов	
А. Н. Взоров, Е. И. Самохвалов, В. В. Чебаненко, Д. В. Щебляков, А. Л. Гинцбург	585
ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА	
Идентификация новых дифференциально экспрессирующихся длинных некодирующих РНК с онкогенным потенциалом	

О. И. Бровкина, И. В. Пронина, Л. А. Урошлев, М. В. Фридман, В. И. Логинов, Т. П. Казубская, Д. О. Уткин, Н. Е. Кушлинский, Э. А. Брага	598
Комбинация <i>цис</i> -регуляторных элементов ARE и HRE повышает активность опухолеспецифического промотора hTERT	
С. В. Калиниченко, И. В. Коробко, М. В. Шепелев	606

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Сайленсинг гена <i>MUC4</i> ингибирует TGF-β1-индуцированный эпителиально- мезенхимальный переход в эпителиальных клетках NCI-H292 респираторного тракта человека через сигнальный путь ERK1/2	
YD. Kim, Y. S. Choi, H. G. Na, SY. Song, C. H. Bae	617
Аутофагия не влияет на ответ линии клеток хронического миелоидного лейкоза, устойчивой к иматинибу, на ингибиторы тирзинкиназ	
S. Baykal-Köse, H. Efe, Z. Yüce	626
USF1 подавляет экспрессию генов, кодирующих фибриллярный коллаген типа I, II И III и pNP ADAMTS-3, в клетках остеосаркомы	
M. Alper, T. Aydemir, F. Köçkar	634
Мезенхимальные стволовые клетки, культивируемые в 3D системе, подавляют рост клеток немелкоклеточного рака легкого за счет зависимой от IL-24 регуляции сигнальных путей p38 MAPK и CXCR4/AKT	
F. Suo, M. Pan, Y. Li, Q. Yan, H. Hu, L. Hou	643
Снижение активности стриатумспецифичной протеин-тирозин-фосфатазы (STEP) в головном мозге <i>Danio rerio</i> под воздействием <i>n</i> -хлорфенилаланина и паргилина	
Е. А. Куликова, Д. В. Фурсенко, Е. Ю. Баженова, А. В. Куликов	660

<i>FOXC1</i> -опосредованное влияние микроРНК miR-204-5р на пролиферацию клеток меланомы	
И. Ю. Дубовцева, М. Б. Аксененко, Е. Д. Николаева, А. С. Аверчук, А. В. Мошев, А. А. Савченко, С. В. Маркова, Т. Г. Рукша	667
Фактор роста эпидермиса участвует в повышении экспрессии онкогена URGCP в клетках гепатомы человека	
E. Tokay	676
Влияние свободных жирных кислот на накопление липидов, активацию лизосом и сдвиг метаболизма различных культивируемых клеток в сторону гликолиза	
Х. С. Вишнякова, К. В. Попов, Х. Рап, М. В. Ясько, Е. Е. Егоров	683
Влияние адипонектина на продукцию аполипопротеинов А-1 и Е макрофагами человека	
Д. А. Танянский, А. С. Трулев, Е. В. Агеева, А. А. Никитин, В. С. Шавва, С. В. Орлов	697

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 577.2:616\_006

# **SCP-ФОСФАТАЗЫ И ОНКОГЕНЕЗ**

© 2021 г. Г. А. Пузанов<sup>*a*</sup>, В. С. Сенченко<sup>*a*, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия \*e-mail: senvera@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.12.2020 г. После доработки 29.12.2020 г. Принята к публикации 30.12.2020 г.

Малые SCP-фосфатазы CTDSP1, CTDSP2 и CTDSPL осуществляют специфическое дефосфорилирование остатков серина и треонина в молекулах белков. Эти ферменты участвуют в регуляции активности PHK-полимеразы II на стадии перехода от инициации транскрипции к элонгации, в регуляции экспрессии нейрон-специфичных генов и активации ключевого белка клеточного цикла pRb на границе фаз G1/S. Кроме того, субстратами SCP-фосфатаз могут быть модуляторы транскрипции SMAD, протеинкиназа AKT1 – регулятор клеточного цикла, апоптоза и ангиогенеза, факторы транскрипции TWIST1 и с-MYC, белки семейства Ras, участвующие в сигнальных путях, регулирующих рост клеток и апоптоз, CDCA3, связанный с клеточным делением, ингибитор циклинзависимых киназ p21, белок промиелоцитарного лейкоза PML, участвующий в регуляции онкосупрессоров p53, PTEN, mTOR. Нарушение функций или инактивация SCP-фосфатаз связаны с развитием различных заболеваний, включая онкологические. Наблюдаемый в последнее время рост интереса к SCP-фосфатазам обусловлен их онкосупрессорными свойствами, а также участием в развитии злокачественных опухолей различной этиологии и локализации. В обзоре рассмотрены свойства SCP-фосфатаз и их роль в онкогенезе. Понимание функций SCP-фосфатаз и механизмов их регуляции может быть полезным при поиске эффективных мишеней для терапии опухолей.

Ключевые слова: SCP-фосфатазы, супрессоры опухолевого роста, онкогенез DOI: 10.31857/S0026898421040091

#### ФУНКЦИИ SCP-ФОСФАТАЗ CTDSP1, CTDSP2, CTDSPL В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Обратимое фосфорилирование белков, осуществляемое киназами и фосфатазами, представляет собой важный механизм передачи сигналов и регуляции их активности у всех живых организмов. В эукариотических клетках фосфорилированию подвергаются главным образом гидроксилсодержащие аминокислотные остатки – серин, треонин и тирозин, основным из которых является серин [1]. Выделяют три основных семейства серин/треониновых фосфатаз: фосфопротеиновые фосфатазы (РРР), металлзависимые фосфатазы (РРМ) и фосфатазы на основе аспартата (семейство FCP/SCP) [2, 3]. В последнее семейство входят шесть подсемейств. Одно из них – подсемейство SCP малых сериновых фосфатаз - состоит из трех высокогомологичных фосфатаз CTD-SP1, CTDSP2 и CTDSPL/CTDSP3 (они же SCP1, SCP2 и SCP3), содержащих каталитический и регуляторный домены в одной полипептидной цепи [4].

#### Характеристика SCP-фосфатаз

Mg<sup>2+</sup>-зависимые SCP-фосфатазы CTDSP1, СТDŠP2, CTDSPL (CTDSP1/2/L), локализованные в клеточном ядре, могут участвовать в регуляции транскрипции генов, а также взаимодействовать с регуляторными белками. Значительное сходство (около 83%) аминокислотных последовательностей этих ферментов (UniProt: O9GZU7 (CTDSP1), O14595 (CTDSP2), O15194 (CTDSPL)) [5] и трехмерных структур указывает на их функциональное сходство (рис. 1). Несмотря на высокую гомологию мотива DXDX(T/V), отвечающего за фосфатазную активность CTDSP1/2/L, эти ферменты имеют различия в N-концевых последовательностях, которые, как предполагают, принимают участие в белок-белковых взаимодействиях. Гены CTDSP1/2/L расположены на разных хромосомах: 2q35, 12q13-q15 и 3p22-p21.3 соответственно, однако профили их тканеспецифичной экспрессии различаются незначительно [6].

Отрицательные заряды, присутствующие как на нуклеофильной, так и на основной аминокислоте

Сокращения: CTD – С-концевой домен (C-terminal domain); CTDSP – малая фосфатаза С-концевого домена (C-terminal domain small phosphatase); CTDSP1/2/L – гены CTDSP1, CTDSP2, CTDSPL.

sp Q9GZU7 CTDSP1	YLL PEAK	AQDSDKICV	VIDLDETLVHSSFKPVN	NADFIIPV
sp 014595 CTDSP2	CLL PEVT	EEDQGRIC	VIDLDETLVHSSFKPIN	NADFIIPI
sp 015194 CTDSPL	YLL PEVT	VLDYGKKCV	VIDLDETLVHSSFKPIS	NADFIIPV
SDIO9CZII7ICTDSP1	REDGATHOWNERD	TORMERI FROM FTASI AK	VANDUANTINK - WEAFD	ADI EDES
spl29820/leibbri	TT DOA A 10 AT ADVICT HADDI	DORDDEDCORTRODAK	THAT AND DEPTC HORE IS	
sp 014595 CTDSP2	RIEGITHOVYVLKRPYVDEN	IRRMGELFECVLFTASLAK	YADPVTDLLDR – CGVFR	ARLFRES
sp 015194 CTDSPL	ELDGTIHDVYVLKRPHVDEJ	LORMGOLFECVLFTASLAK	YADPVADLLDR – NGVER	ARLFRES
1 .				
SDIO9GZU7ICTDSP1	WEHRCHWUKDI SRI CRDI	REVELTE DISSPESSIVE HPDDI	NUMBER OF STREET	T.T.PETER
5912301071012011				
sp 014595 CTDSP2	CVFHQGCYVKDLSRLGRDL	RKTL ILDNSPASYIFHPEN	AVPVQSWEDDMADTELLI	ILTPIFEE
sp 015194 CTDSPL	CVFHRGNYVKDLSRLGREL	SKVITVDNSPASYIFHPEN	AVPVQSWEDDMTD TELLI	LIPFFEG

**Рис. 1.** Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей областей активного центра белков CTDSP1, CTDSP2 и CTDSPL (выполнено с помощью приложения T-COFFEE, версия 11) [5]. Цвет (темно-серый и светло-серый) отражает различную степень совпадения аминокислотных остатков.

(аспартат) фосфатаз CTDSP1/2/L, нейтрализуются ионами магния, необходимыми для связывания субстрата и ферментативной активности. После нуклеофильной атаки образуется промежуточное соединение аспартилфосфата, которое взаимодействует с молекулой воды с образованием дефосфорилированного серина и неорганического фосфата. Формирование фосфоаспартильного интермедиата — ключевая особенность, которая отличает ферменты семейства FCP/SCP от других металлзависимых фосфатаз [7]. Считается, что Mg<sup>2+</sup> облегчает протекание обеих стадий реакции, нейтрализуя отрицательный заряд фосфатной группы. Определены пространственные структуры SCPфосфатаз, а также представлены схемы механизма действия этих ферментов [2, 7–10].

#### Фосфорилирование С-концевого домена РНК-полимеразы II

Активность фосфатаз семейства FCP/SCP, действующих на C-концевой домен (CTD) PHKполимеразы II, впервые обнаружена во фракции клеток HeLa [11]. Фосфатазы этого экстракта способны переводить гиперфосфорилированную РНК-полимеразу II в гипофосфорилированное состояние. Способность модифицированной таким образом РНК-полимеразы II связывать промотор аденовируса типа 2 (Ad2-MLP) стала одним из первых доказательств того, что фосфорилированная форма CTD играет важную роль в узнавании промотора [12]. Повторяющаяся область CTD самой большой субъединицы РНК-полимеразы II играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов и служит структурным элементом, объединяющим такие различные процессы, как транскрипция, процессинг мРНК и др. [13]. Активность CTD зависит от статуса его фосфорилирования, за который ответственны СТD-фосфатазы и киназы [14]. SCP-фосфатазы CTDSP1/2/L могут катализировать дефосфорилирование Ser5 в консенсусном повторе Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7 CTD большой субъединицы PHK-полимеразы II, участвуя, таким образом, в негативной регуляции транскрипции, а также контролировать статус фосфорилирования иных субстратов, помимо CTD-домена [15].

Киназы и фосфатазы определяют статус посттрансляционной модификации СТD РНК-полимеразы II, значимый для регуляторов транскрипции. Совокупное действие этих факторов обеспечивает нужную последовательность транскрипционных процессов [16]. Большинство CTDкиназ принадлежат к семейству циклинзависимых киназ (CDK), что подразумевает связь между регуляцией клеточного цикла и транскрипцией [17]. SCP-фосфатазы предпочтительно дефосфорилируют Ser5 в гептапептидных повторах СТD РНКполимеразы II. На стадии элонгации транскрипции активность РНК-полимеразы II негативно регулирует не только фосфатаза FCP1, активный центр которой сходен с активными центрами других членов семейства SCP, но и другие фосфатазы. Консервативная эукариотическая фосфатаза FCP1 предпочитает в качестве субстрата Ser2 СТD РНК-полимеразы II [18-20]. SCP-фосфатазы представлены в клетках высших эукариот, они предпочтительно дефосфорилируют Ser5, а не Ser2 [15], обладают гомологией с FCP1 по аминокислотной последовательности фосфатазного домена ( $\sim 20\%$ ) и сходной третичной структурой [4, 21]. Статус фосфорилирования двух наиболее хорошо изученных остатков СТД РНК-полимеразы II (Ser5 и Ser2) коррелирует со стадиями транскрипции. В зависимости от состояния фосфорилирования CTD может различать мишени, с которыми связывается, и инициировать транскрипцию [22].

Дефосфорилированный СТD связывает белки преинициаторного комплекса. Фосфорилированный остаток Ser5 СТD РНК-полимеразы II способен инициировать транскрипцию, но не может войти в фазу элонгации и транскрибировать всю мРНК. Кроме того, СТD РНК-полимеразы II, фосфорилированный по Ser5 и Ser2, распознается факторами сплайсинга и необходим для сборки сплайсосомы и эффективного протекания реакций сплайсинга в процессе элонгации [[23].

#### Регуляция транскрипции нейронных генов

Эволюционно консервативные регуляторы экспрессии нейронспецифичных генов - SCPфосфатазы CTDSP1/2/L, входят в состав комплекса REST (RE-1-Silencing Transcription factor), который специфично связывается с участком ДНК репрессорного элемента RE-1 (Repressor Element 1) длиной 23 п.н., обнаруженный более чем в 1000 генов нейронов [6]. SCP-фосфатазы участвуют в подавлении экспрессии нейронных генов посредством регуляции активности комплекса REST. Профили экспрессии генов CTDSP1/2/L и *REST* сходны во всех клетках, кроме нейронов [24]. Согласно последним данным, REST действительно служит субстратом CTDSP1 in vivo. Коме того, CTDSP1 защищает REST от деградации [25]. Активность нейронных генов человека зависит от активности микроРНК (miR-124), подавляющей экспрессию гена CTDSP1 [26]. Низкомолекулярные ингибиторы, нацеленные на CTDSP1/2/L, могут быть полезны для изучения функции REST в различных типах клеток, а также патогенеза таких заболеваний, как глиобластома [25, 27], при которой наблюдается сверхэкспрессия REST.

#### Участие в регуляции клеточного цикла

Белок ретинобластомы pRb – ключевой участник сигнального пути p16<sup>ink4A</sup>–Cdk/циклин–Rb, ответственный за остановку клеточного деления на границе фаз G<sub>1</sub>/S клеточного цикла [28]. Активность pRb регулируется посттрансляционными модификациями, среди которых преобладает фосфорилирование, осуществляемое комплексами CDK4-циклин D и CDK2-циклин E, что способствует прогрессии S-фазы клеточного цикла [29, 30]. На ранней стадии фазы G1 белок pRb подвергается монофосфорилированию комплексами циклина D с CDK4/6, в то время как для выхода из клеточного цикла необходима дефосфорилированная форма pRb [31]. Известно, что фосфорилирование в нескольких сайтах экзона 23 RB, включая Ser780, Ser807/811 и Ser795, приводит к ингибированию его связывания с факторами транскрипции E2F [32, 33].

CTDSP1 взаимодействует с белком CDCA3, связанным с делением клеток и необходимым для вступления клеток в митоз. CDCA3 входит в состав комплекса убиквитин-лигазы E3, который опосредует убиквитинирование и деградацию киназы WEE1, ключевого регулятора фазы G2/M, подавляющего активность циклинзависимых киназ CDK1 и CDK2 [34, 35]. Колориметрическим методом с использованием малахитового зеленого показано, что вероятным субстратом CTDSP1 является СDCA3 [36, 37]. Повышение экспрессии *СТДУР2* приводит к снижению количества клеток в S-фазе [38], а также к активации генов семейства *RAS*, которые, в свою очередь, регулируют экспрессию Р21 [38]. Гены RAS кодируют белки сигнальных путей, регулирующих рост клеток и апоптоз [39, 40]. Белок Р21, ингибитор циклинзависимых киназ, подавляет активацию комплекса циклин E/CDK2, необходимого для фосфорилирования pRb [41]. CTDSP1/2/L могут дефосфорилировать белок pRb in vitro по остаткам Ser807/811, Ser780 и Ser795 [5, 42].

#### Другие субстраты SCP-фосфатаз

CTDSP1/2/L регулируют не только РНК-полимеразу II, экспрессию нейронспецифичных генов с участием комплекса REST и клеточный цикл (pRb, CDCA3, и др.), они взаимодействуют и с другими субстратами. Эти фосфатазы дефосфорилируют белок SMAD1, отрицательно регулируя тем самым сигнальный путь морфогенетических белков костной ткани (BMP) [43]. SMAD1 является сигнальным белком пути TGF-β/BMP, который активирует рецепторы серин-треониновых киназ и играет важную роль в остеобластогенезе и формировании кости [44]. CTDSP1/2/L способны дефосфорилировать также N-концевые и линкерные области белков SMAD2 и SMAD3 (кроме пары CTDSP1–SMAD3), усиливая сигнальный путь TGF-β, который контролирует многие клеточные функции, включая пролиферацию и дифференцировку. Белки SMAD преобразуют сигналы и действуют как модуляторы транскрипции, вовлеченные в разнообразные сигнальные пути [45].

СТDSP1/2/L могут дефосфорилировать и стабилизировать белок SNAIL, ключевой репрессор транскрипции гена Е-кадгерина, важного регулятора нескольких сигнальных путей, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом, клеточной адгезией и миграцией клеток [45]. Таким образом, стабилизация SNAIL, усиливая супрессию Е-кадгерина, способствует миграции клеток *in vitro*. Известна также способность фосфатазы СТDSP1 дефосфорилировать белок TWIST1, участвующий в подавлении экспрессии Е-кадгерина. При этом фосфорилирование N-концевого Ser68 способствует деградации белка TWIST1 [46].

Недавно обнаружено, что CTDSP1 локализованная преимущественно на плазматической мембране различных клеток, негативно регулирует активность белков РКВ/АКТ, входящих в семейство протеинкиназы В, с последующим нарушением ангиогенеза [47]. Подобные свойства СТDSP1 вызывают большой интерес, поскольку в плазматических мембранах локализованы только несколько серин/треониновых фосфатаз (из приблизительно 30 известных серин/треониновых и 107 тирозиновых протеинфосфатаз) [2, 48]. В эндотелиальных клетках сигнальные белки АКТ стимулируют ангиогенез. Они перемещаются к клеточной мембране, где активируются и запускают дальнейшие сигнальные события. Активация белков АКТ происходит через фосфатную группу, присоединенную к конкретному сайту [49].

Дополнительные взаимодействия белков с SCP-фосфатазами обнаружены нами с помощью приложения STRING на основе геномного контекста (соседство, слияние, совпадение генов), высокопроизводительного секвенирования (база данных NCBI Gene Expression Omnibus), коэкспрессии, интеллектуального анализа текста и известных баз данных, таких как KEGG, Reactome, BioCyc, Gene Ontology и BioCarta [50]. В группу экспериментально полтвержденных взаимодействий с SCP-фосфатазами, помимо уже описанных (SMAD1-3, REST, CDCA3 и др.), вошли еще пять белков (рис. 2). В том числе основной белок миелина (МВР), классические изоформы 4–14 которого участвуют в миелинизации и поддержании структуры миелиновой оболочки в центральной нервной системе [51]. UBLCP1, который дефосфорилирует ядерные 26S протеасомы, снижая тем самым их протеолитическую активность и предотвращая сборку "коровых" и регуляторных частиц в зрелую 268 протеасому. GTF2F1 – субъединица 1 общего фактора транскрипции IIF (TFIIF), связывается с РНК-полимеразой II и помогает рекрутировать ее в комплекс инициации с фактором транскрипции IIB (TFIIB), что способствует элонгации транскрипции [15]. Белок СТВР2 действует как корепрессор транскрипции [52]. Фактор роста GDF5 участвует в формировании костной и хряшевой ткани [53]. Взаимодействие CTDSP1 и CTDSPL выявлено в клетках НЕК293Т почки человека на основе анализа интерактома BioPlex, системы мультиплексного анализа, включающего данные высокопроизводительной масс-спектрометрии с аффинной очисткой [54].

В группу предсказанных значимых функциональных ассоциаций с SCP-фосфатазами вошли семь белков: CTDP1, принадлежащий к семейству фосфатаз FCP/SCP [55]; MATN3 — матрилин-3, главный компонент внеклеточного матрикса хряща [56]; ASPN — аспорин, играющий важную роль в гомеостазе хряща и патогенезе остеоартрита [57]; FRZB, связанный с регуляцией роста и дифференцировки клеток [58]; ITGA9 интегрин альфа-9, рецептор молекулы 1 адгезии сосудистых клеток (VCAM), цитотактин и остеопонтин [59]; S100A9 и S100A8 — кальций- и цинксвязывающие белки, играющие важную роль в регуляции воспаления и иммунного ответа [60]. Взаимодействие этих белков с SCP-фосфатазами нуждается в дальнейшем экспериментальном подтверждении.

Продолжается поиск новых субстратов фосфатаз CTDSP1, CTDSP2 и CTDSPL. На примере CTDSP1 предложены новые методические подходы к идентификации субстратов и ингибиторов фосфатаз семейства FCP/SCP [10]. Разработан новый метод фагового дисплея библиотек потенциальных субстратов [61]. Оба метода основаны на том, что молекулы фторида алюминия (AlF4, AlF3) и трифторида бериллия (BeF3) образуют комплексы с Mg<sup>2+</sup> в каталитическом центре FCP/SCP-фосфатаз, что имитирует переходное состояние гидролиза и промежуточное соединение аспартилфосфата [62]. Сравнение аминокислотных последовательностей потенциальных субстратов CTDSP1, выявленных этим методом, позволяет предположить, что трипептиды Ser-Thr-Tyr и Pro-Phe-Glu (один или оба) могут быть связывающими мотивами, распознаваемыми CTDSP1 [61].

#### УЧАСТИЕ SCP-ФОСФАТАЗ В ОНКОГЕНЕЗЕ

В последние годы появляется все больше доказательств участия SCP-фосфатаз в процессах, связанных с развитием, прогрессией опухолей и способностью подавлять рост различных опухолевых клеток человека.

#### CTDSP1

Фосфатаза СТДУР1, как показано методом коиммунопреципитации, может прямо связываться с С-концевым доменом с основной структурой спираль-петля-спираль транскрипционного фактора и протоонкогена с-МҮС. CTDSP1 взаимодействует с с-МҮС в опытах in vivo и in vitro и способна подавлять пролиферацию опухолевых клеток HepG2 и SMMC-7721 путем дефосфорилирования с-МҮС по Ser62, причем для фосфатазной активности CTDSP1 необходим С-концевой Ser245. Снижение экспрессии гена CTDSP1 способствует пролиферации клеток HepG2, а его нокдаун приводит к повышению уровня белка с-МҮС в клетках рака печени. Таким образом, CTDSP1 негативно регулирует пролиферацию клеток рака печени и, дефосфорилируя с-МҮС по Ser62, действует как потенциальный опухолевый супрессор [63].

Экспрессия гена *CTDSP1* отрицательно коррелирует с экспрессией *TWIST1* в четырех клеточных линиях с морфофенотипом рака молочной железы *in vitro*. Сверхэкспрессия *CTDSP1* ускоряет деградацию TWIST1 и подавляет опосредованную TWIST1 миграцию и инвазию клеток MDA-MB-436 и MCF7 *in vitro* [46]. Фосфатаза CTDSP1 дефосфорилирует Ser68, локализован-



**Рис. 2.** Схемы белок-белковых взаимодействий CTDSP1 (*a*), CTDSP2 (*б*) и CTDSPL (*в*) на основе базы данных STRING (Приложение для поиска взаимодействий генов и белков). Линиями показаны связи (прямые или опосредованные). Толщина линий соответствует степени доказанности взаимодействия: жирные линии – экспериментально показанные прямые взаимодействия белков, тонкие – предсказанные ассоциации.

ный на N-конце белка TWIST1, что способствует деградации этого белка, участвующего в подавлении экспрессии Е-кадгерина [46]. Известно, что инактивация Е-кадгерина приводит к усилению метастазирования опухолевых клеток [64]. Таким образом, CTDSP1 может подавлять способность клеток к инвазии и метастазированию посредством дефосфорилирования TWIST1, регулирующего экспрессию Е-кадгерина.

Оценено также влияние самого распространенного метаболита холестерина и фактора риска рака молочной железы — гидроксихолестерина 27 (27-HC) — на онкобелок с-МҮС, сверхэкспрессия которого характерна для рака молочной железы

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

[65]. 27-НС подавляет экспрессию *CTDSP1*, что приводит к стабилизации белка с-МҮС, а также транскрипцию трех ключевых негативных модуляторов стабильности белка с-МҮС – РР2А, CTDSP1 и FBW7. С помощью секвенирования ДНК следующего поколения (ChIPBase) выявлено участие ряда предполагаемых факторов, включая с-МҮС, в регуляции транскрипции. Полученные результаты позволяют по-новому посмотреть на механизм активации с-МҮС с участием 27-НС и путем подавления транскрипции генов *PP2A*, *CTDSP1* и *FBW7* для повышения стабильности белка с-МҮС в клетках рака молочной железы.

Белки семейства протеинкиназы В (PKB/AKT) участвуют в регуляции клеточного цикла, апоптозе и ангиогенезе. Значительно снижая киназную активность AKT, CTDSP1 негативно регулирует ангиогенез. Обнаружен ключевой сайт дефосфорилирования протеинкиназой – Ser473. В опытах *in vivo* показано, что в эндотелиальных клетках мышей с инактивированным геном *CTDSP1* повышен уровень фосфорилированных белков AKT, при этом наблюдается рост новых кровеносных сосудов и быстрый рост рака легкого. Согласно этим данным, CTDSP1 действует как негативный регулятор ангиогенеза, играющего ключевую роль в онкогенезе [47].

С помощью нокдауна гена деубиквитиназы (USP29) в клетках рака желудка MGC-803 и BGC-823 показано, что, взаимодействуя с фосфатазой CTDSP1 для стабилизации белка SNAIL, USP29 способствует миграции клеток. USP29 усиливает взаимодействие SNAIL и CTDSP1, что приводит к одновременному дефосфорилированию и деубиквитинированию SNAIL и к предотвращению деградации белка SNAIL, который может способствовать эпителиально-мезенхимальному переходу и метастазированию опухолевых клеток [66].

#### CTDSP2

Локус 12q13-q15, в котором расположен ген *СТDSP2*, часто амплифицирован в образцах первичных опухолей и в клеточных линиях остеосаркомы и глиобластомы [67, 68]. Выявление ключевых генных модулей глиобластомы с применением биоинформатического анализа, учитывающего нарушение регуляции экспрессии генов в результате генетических изменений, позволило идентифицировать *СTDSP2* как один из 17 генов (наряду с *RB1*), связанных с плохой выживаемостью пациентов [69].

Ген CTDSP2 служит мишенью транскрипционных факторов семейства FOXO (Forkhead box О) и может вызывать остановку клеточного цикла in vitro. Промотор CTDSP2 содержит сайт связывания FOXO, который участвует во многих сигнальных путях и играет важную роль в ряде физиологических и патологических процессов, включая онкологические. Эктопическая экспрессия генов FOXO1, FOXO3 или FOXO4 повышает уровень мРНК CTDSP2, что приводит к снижению количества клеток остеосаркомы человека (U2OS) в S-фазе [38]. Кроме того, экспрессия CTDSP2 повышается в ответ на ингибиторы PI3K или PKB/AKT, контролирующие активность эндогенных белков FOXO в клетках остеосаркомы (U2OS) и колоректальной аденокарциномы (DLD1) [70]. Фосфатаза CTDSP2, ингибируя RAS и P21, нарушение функции которых часто встречается во многих видах рака, способна участвовать в прогрессии клеточного цикла [71, 72].

#### **CTDSPL**

В ходе поиска генетических нарушений хромосомы 3 человека обнаружен локус (3р12-р2), обогащенный генами-супрессорами, вовлеченными в патогенез опухолей различного вида/типа, в котором расположен ген CTDSPL (он же SCP3, HYA22, RBSP3). Способность CTDSPL подавлять рост опухолевых клеток in vitro и in vivo впервые показали с помощью трансфекции клеток KRC Y (морфофенотип светлоклеточного рака почки) и ACC-LC5 (морфофенотип мелкоклеточного рака легкого) [42]. Кроме того, экзогенную экспрессию гена CTDSPL наблюдали в ядрах клеток линии MCF-7 (морфофенотип опухоли молочной железы), трансфицированных этим геном. Экспрессия CTDSPL сопровождалась снижением содержания неактивного фосфорилированного по С-концу белка pRb за счет дефосфорилирования в сайте Ser807/811, что свидетельствовало о вкладе CTDSPL в активацию белка pRb, ключевого участника сигнального пути p16<sup>ink4A</sup>–Cdk/cyclin–Rb, ответственного за остановку клеточного деления на границе фаз  $G_1/S$  [42].

Выявление соматических гипермутаций в генах-супрессорах способствует пониманию возникновения, развития, прогрессии и распространения рака. Обнаружена высокая частота соматических мутаций в генах *RASSF1* и *CTDSPL* (*RBSP3*) при различных онкозаболеваниях [73]. Показано значительное и частое снижение экспрессии гена *CTDSPL* в опухолях легкого, шейки матки [74, 75], оценено клиническое и прогностическое значение частых нарушений *CTDSPL* на ранних и поздних стадиях рака молочной железы [76], в ранних дисплазиях головы и шеи [77], цервикальных интраэпителиальных неоплазиях [78], плоскоклеточном раке головы и шеи [79].

Важную роль в контроле экспрессии генов-супрессоров играет метилирование — механизм инактивации, способствующий злокачественной трансформации клеток. Предложен метод анализа метилирования и/или делеций на NotI-микрочипах, содержащих клонированные геноспецифичные фрагменты ДНК хромосомы 3, предварительно обогащенные NotI-сайтами [80]. С помощью этого метода обнаружено метилирование и/или делеции в генах, в том числе *CTDSPL*, при различных видах рака: яичников, легкого, шейки матки, почки, предстательной железы [81–85].

Показано, что корреляция между падением экспрессии генов *CTDSPL* и *P16* в опухолях шейки матки (в клетках базально-парабазального слоя) и увеличением фосфорилированной формы pRb (сайты фосфорилирования Ser807/811 и Ser567)-ассоциирована с неблагоприятным прогнозом при этом заболевании. Кроме того, высокую частоту делеций *CTDSPL* и *P16* наблюдали при дисплазии шейки матки и в ходе прогрессии заболевания. Изменение экспрессии *CTDSPL* и *P16* оказалось синергичным, было связано с увеличением уровня фосфорилированного pRb в опухолях и коррелировало с неблагоприятным прогнозом у пациентов [75].

Согласно TargetScan (http://targetscan.org/), микроРНК miR-7 также может действовать как регулятор экспрессии CTDSPL и RB1, повышение уровня которых зависело от стадии немелкоклеточного рака легкого [86]. При остром миелоидном лейкозе CTDSPL служит мишенью miR-100, которая может регулировать переход G1/S. Сверхэкспрессия miR-100 в клетках HL60 (лейкоз человека) приводит к ингибированию CTDSPL и одновременно к повышению способности фосфорилированной формы активировать pRb и высвобождению фактора транскрипции E2F1 [87]. CTDSPL также служит мишенью miR-181b - члена семейства miR-181, активация которого индуцирует прогрессию клеточного цикла при увеальной меланоме человека. Сверхэкспрессия miR-181b ингибирует экспрессию CTDSPL, что, в свою очередь, может приводить к повышению содержания фосфорилированной формы pRb и накоплению активной формы E2F1, способствующему прогрессии клеточного цикла в клетках увеальной меланомы [88].

#### CTDSP1/2/L

Известно, что белок промиелоцитарного лейкоза (PML) вовлечен в сигнальные пути ряда опухолевых супрессоров, включая p53 [89], PTEN/ АКТ [90] и mTOR [91]. Фосфатазы CTDSP1/2/L дефосфорилируют PML по остатку Ser518, блокируя убиквитинирование и деградацию PML, опосредованные пептидилпролилизомеразой (PIN1) и убиквитинлигазой KLHL20 [92]. Снижение уровня активности CTDSP1 и CTDSPL при светлоклеточном раке почки коррелирует с фосфорилированием PML по Ser518, метаболизмом PML и высокой степенью злокачественности опухолей. Восстановление CTDSP1-опосредованной стабилизации PML подавляет не только пролиферацию, миграцию, инвазию, ангиогенез и рост светлоклеточного рака почки, но и путь mTOR-HIF. Блокирование деградации PML при этом виде рака за счет сверхэкспрессии CTDSP1 или ингибирования PIN1 усиливало противоопухолевое действие темсиролимуса, селективного ингибитора mTORкиназы. Таким образом, обнаружен новый путь деградации белка PML при светлоклеточном раке почки, включающий инактивацию SCP-фосфатаз,

и участие этого пути в прогрессии рака почки. Обосновано применение комбинированной терапии рака почки, направленной на деградацию PML и ингибирование mTOR [92].

Недавно обнаружены супрессорные свойства CTDSP1, CTDSP2 и CTDSPL, приводящие к значительному замедлению роста и старению клеток А549 (морфофенотип аденокарциномы легкого) in vitro. которые могут реализоваться за счет увеличения доли активной формы белка pRb, дефосфорилированного по сайтам Ser807/811, Ser780 и Ser795. Кроме того, выявлено частое (86%) и высоко скоординированное ( $r_s = 0.53 - 0.62, P \le 0.01$ ) падение экспрессии CTDSP1/2/L и RB1 в первичных опухолях аденокарциномы и плоскоклеточного рака легкого. Показано четкое различие уровней мРНК *СТДSP1*, *СТДSPL* и *RB1* в образцах аденокарциномы с метастазами в лимфатические узлы и без них. что предполагает их использование в качестве биомаркеров метастатического статуса Онкогенный кластер miR-96/182/183 может быть общим регулятором экспрессии трех фосфатаз. Эти результаты отражают функциональную связь SCP-фосфатаз и расширяют знания об их супрессорных свойствах [5].

МикроРНК (miR-26a и miR-26b), кодируемые интронами генов CTDSP1/2/L, синергически снижают долю фосфорилированной формы pRb (ppRb) и блокируют прогрессию клеточного цикла на границе фаз G1/S, подавляя CDK6 и циклин Е1 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы [93]. Совместное действие CTDSP1/2/L и miR-26 в сигнальном пути p16INK4A/pRb может проявляться двумя независимыми способами (посредством дефосфорилирования и на уровне транскрипции), приводящими к активации белка pRb, защищающего клетки от повышенной пролиферации [93]. Таким образом, miR-26a/b и их геныхозяева регулируют фосфорилирование pRb посредством различных молекулярных механизмов. Кроме того, показано, что с-Мус может подавлять регуляцию как членов семейства miR-26, так и SCP-фосфатаз, и в конечном итоге способствует переходу G1/S. Эти результаты дают новое представление о сложном контроле перехода G1/S и предполагают существование одного генного локуса, который содержит два независимых взаимодействующих элемента, подавляющих рост клеток, а также раскрывают новый механизм, с помощью которого с-Мус способствует прогрессии клеточного шикла путем подавления локуса гена. несущего как микроРНК, так и ген, кодирующий белок [93].

За последние годы возрос интерес к практическим приложениям SCP-фосфатаз. Селективные ингибиторы транскрипции обладают явными преимуществами в качестве противоопухолевых средств, поскольку считаются менее генотоксичными по сравнению с химио- или лучевой терапией. Известно, что опухолевым клеткам присущ высокий уровень транскрипции определенных генов, поэтому на основе ингибиторов транскрипции разработаны противоопухолевые препараты [94], в том числе ингибиторы фосфорилирования Ser2 и Ser5 PHK-полимеразы II [95]. Пристальное внимание в качестве потенциальных противоопухолевых средств, направленных на ингибирование транскрипции, привлекают SCP-фосфатазы, дефосфорилирующие Ser2 и Ser5 PHK-полимеразы II.

Сочетание прогнозирования мишеней и количественной оценки экспрессии показало, что miR-18a подавляет экспрессию генов-супрессоров *PTEN*, *WNK2*, *SOX6*, *BTG3*, *CTDSPL* в клетках CaSki (морфофенотип рака шейки матки). Эти гены предложены в качестве вероятных мишеней miR-18a. Прогностическую значимость экспрессии этих генов при раке шейки матки оценили на выборке из 60 пациенток. Самая низкая выживаемость отмечена у пациенток с наиболее низкими уровнями экспрессии генов, включая *CTDSPL*. Эти данные подтверждают возможность использования уровней экспрессии генов в опухолях шейки матки в качестве прогностических маркеров эффективности терапии [96].

Иринотекан, специфически действующий на ДНК-топоизомеразу I (Торо I), применяют при различных солидных опухолях, но на терапию отвечают только 13–32% пациентов, что связано с формированием устойчивости к этому препарату, обусловленной высокой скоростью деградации Торо I. Быструю деградацию Торо I обеспечивает дерегуляция каскада ДНК-зависимых протеинкиназ. Фосфатаза CTDSP1 идентифицирована в качестве первичного регулятора ДНК-зависимых протеинкиназ в ответ на ингибиторы Торо I. Показано, что CTDSP1 способствует поддержанию чувствительности к иринотекану за счет предотвращения деградации Торо I при колоректальном раке [97].

Функции SCP-фосфатаз CTDSP1, CTDSP2 и CTDSPL, их влияние на свойства опухолевых клеток (способность к миграции, скорость роста, ангиогенез), а также роль в онкогенезе вызывают большой интерес. Выявление и изучение новых физиологических субстратов SCP-фосфатаз, а также способы их регуляции важны для разработки новых подходов и поиска эффективных мишеней для терапии различных видов опухолей.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-0400268).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Olsen J.V., Blagoev B., Gnad F., Macek B., Kumar C., Mortensen P., Mann M. (2006) Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* **127**, 635–648.
- 2. Shi Y. (2009) Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell.* **139**, 468–484.
- 3. Seifried A., Schultz J., Gohla A. (2013) Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS J.* **280**, 549–571.
- Zhang Y., Kim Y., Genoud N., Gao J., Kelly J.W., Pfaff S.L., Gill G.N., Dixon J.E., Noel J.P. (2006) Determinants for dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by Scp1. *Mol. Cell.* 24, 759–770.
- Krasnov G.S., Puzanov G.A., Afanasyeva M.A., Dashinimaev E.B., Vishnyakova K.S., Beniaminov A.D., Adzhubei A.A., Kondratieva T.T., Yegorov Y.E., Senchenko V.N. (2019) Tumor suppressor properties of the small C-terminal domain phosphatases in non-small cell lung cancer. *Biosci. Repts.* **39**(12), BSR20193094. https://doi.org/10.1042/BSR20193094
- Yeo M., Lee S.K., Lee B., Ruiz E.C., Pfaff S.L., Gill G.N. (2005) Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression. *Science*. 307, 596–600.
- 7. Zhang M., Yogesha S.D., Mayfield J.E., Gill G.N., Zhang Y. (2013) Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers. *FEBS J.* **280**, 4739–4760.
- Kamenski T., Heilmeier S., Meinhart A., Cramer P. (2004) Structure and mechanism of RNA polymerase II CTD phosphatases. *Mol. Cell.* 15, 399–407.
- Almo S.C., Bonanno J.B., Sauder J.M., Emtage S., Dilorenzo T.P., Malashkevich V., Wasserman S.R., Swaminathan S., Eswaramoorthy S., Agarwal R., Kumaran D., Madegowda M., Ragumani S., Patskovsky Y., Alvarado J., Ramagopal U.A., Faber-Barata J., Chance M.R., Sali A., Fiser A., Zhang Z.Y., Lawrence D.S., Burley S.K. (2007) Structural genomics of protein phosphatases. *J. Struct. Funct. Genomics.* 8, 121–140.
- Rallabandi H.R., Ganesan P., Kim Y.J. (2020). Targeting the C-terminal domain small phosphatase 1. *Life* (Basel). **10**(5), 57. https://doi.org/10.3390/life10050057
- Chambers R.S., Dahmus M.E. (1994) Purification and characterization of a phosphatase from HeLa cells which dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 269, 26243–26248.
- Chesnut J.D., Stephens J.H., Dahmus M.E. (1992) The interaction of RNA polymerase II with the adenovirus-2 major late promoter is precluded by phosphorylation of the C-terminal domain of subunit IIa. J. Biol. Chem. 267, 10500–10506.
- 13. Egloff S., Murphy S. (2008) Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet: TIG.* 24, 280–288.
- Palancade B., Marshall N.F., Tremeau-Bravard A., Bensaude O., Dahmus M.E., Dubois M.F. (2004) Dephosphorylation of RNA polymerase II by CTD-phosphatase FCP1 is inhibited by phospho-CTD associating proteins. J. Mol. Biol. 335, 415–424.
- 15. Yeo M., Lin P.S., Dahmus M.E., Gill G.N. (2003) A novel RNA polymerase II C-terminal domain phos-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

phatase that preferentially dephosphorylates serine 5. *J. Biol. Chem.* **278**, 26078–26085.

- Jeronimo C., Bataille A.R., Robert F. (2013) The writers, readers, and functions of the RNA polymerase II C-terminal domain code. *Chem. Rev.* 113, 8491–8522.
- 17. Mayfield J.E., Burkholder N.T., Zhang Y.J. (2016) Dephosphorylating eukaryotic RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta.* **1864**, 372–387.
- Archambault J., Chambers R.S., Kobor M.S., Ho Y., Cartier M., Bolotin D., Andrews B., Kane C.M., Greenblatt J. (1997) An essential component of a Cterminal domain phosphatase that interacts with transcription factor IIF in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 14300–14305.
- Cho E.J., Kobor M.S., Kim M., Greenblatt J., Buratowski S. (2001) Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II Cterminal domain. *Genes Dev.* 15, 3319–3329.
- Hausmann S., Shuman S. (2002) Characterization of the CTD phosphatase Fcp1 from fission yeast. Preferential dephosphorylation of serine 2 versus serine 5. *J. Biol. Chem.* 277, 21213–21220.
- Ghosh A., Shuman S., Lima C.D. (2008) The structure of Fcp1, an essential RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol. Cell.* 32, 478–490.
- Bataille A.R., Jeronimo C., Jacques P., Laramée L., Fortin M., Forest A., Bergeron M., Hanes S.D., Robert F. (2012) A universal RNA polymerase II CTD cycle is orchestrated by complex interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes. *Mol. Cell.* 45, 158–170.
- Nojima T., Rebelo K., Gomes T., Grosso A.R., Proudfoot N.J., Carmo-Fonseca M. (2018) RNA polymerase II phosphorylated on CTD serine 5 interacts with the spliceosome during co-transcriptional splicing. *Mol. Cell.* **72**, 369–379, e364.
- Visvanathan J., Lee S., Lee B., Lee J.W., Lee S.K. (2007) The microRNA miR-124 antagonizes the antineural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev.* 21, 744–749.
- Burkholder N.T., Mayfield J.E., Yu X., Irani S., Arce D.K., Jiang F., Matthews W.L., Xue Y., Zhang Y.J. (2018) Phosphatase activity of small C-terminal domain phosphatase 1 (SCP1) controls the stability of the key neuronal regulator RE1-silencing transcription factor (REST). J. Biol. Chem. 293, 16851–16861.
- Sun A.G., Wang M.G., Li B., Meng F.G. (2017) Downregulation of miR-124 target protein SCP-1 inhibits neuroglioma cell migration. *Eur. Rev. Med. Pharm. Sci.* 21, 723–729.
- Conti L., Crisafulli L., Caldera V., Tortoreto M., Brilli E., Conforti P., Zunino F., Magrassi L., Schiffer D., Cattaneo E. (2012) REST controls self-renewal and tumorigenic competence of human glioblastoma cells. *PLoS One.* 7, e38486.
- Osada H., Takahashi T. (2002) Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene*. 21, 7421–7434.
- Rubin S.M. (2013) Deciphering the retinoblastoma protein phosphorylation code. *Trends Biochem. Sci.* 38, 12–19.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

- Lundberg A.S., Weinberg R.A. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Boil.* 18, 753–761.
- Narasimha A.M., Kaulich M., Shapiro G.S., Choi Y.J., Sicinski P., Dowdy S.F. (2014) Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *eLife*. **3**, e02872. https://doi.org/10.7554/eLife.02872
- 32. Knudsen E.S., Wang J.Y. (1997) Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5771–5783.
- Rubin S.M., Gall A.L., Zheng N., Pavletich N.P. 2005. Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell.* 123, 1093–1106.
- 34. Watanabe N., Arai H., Nishihara Y., Taniguchi M., Watanabe N., Hunter T., Osada H. (2004) M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 101, 4419–4424.
- Moiseeva T.N., Qian C., Sugitani N., Osmanbeyoglu H.U., Bakkenist C.J. (2019) WEE1 kinase inhibitor AZD1775 induces CDK1 kinase-dependent origin firing in unperturbed G1- and S-phase cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 116, 23891–23893.
- Maehama T., Taylor G.S., Slama J.T., Dixon J.E. (2000) A sensitive assay for phosphoinositide phosphatases. *Analyt. Biochem.* 279, 248–250.
- 37. Kim Y.J., Bahk Y.Y. (2014) A study of substrate specificity for a CTD phosphatase, SCP1, by proteomic screening of binding partners. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **448**, 189–194.
- 38. Kloet D.E., Polderman P.E., Eijkelenboom A., Smits L.M., van Triest M.H., van den Berg M.C., Groot Koerkamp M.J., van Leenen D., Lijnzaad P., Holstege F.C., Burgering B.M. (2015) FOXO target gene *CTDSP2* regulates cell cycle progression through Ras and p21(Cip1/Waf1). *Biochem. J.* 469, 289–298.
- 39. Barbacid M. (1987) Ras genes. Annu. Rev. Biochem. 56, 779–827.
- Cox A.D., Der C.J. (2003) The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene*. 22, 8999–9006.
- Stewart Z.A., Leach S.D., Pietenpol J.A. (1999) p21(Waf1/Cip1) inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption. *Mol. Cell. Biol.* 19, 205–215.
- Kashuba V.I., Li J., Wang F., Senchenko V.N., Protopopov A., Malyukova A., Kutsenko A.S., Kadyrova E., Zabarovska V.I., Muravenko O.V., Zelenin A.V., Kisselev L.L., Kuzmin I., Minna J.D., Winberg G., Ernberg I., Braga E., Lerman M.I., Klein G., Zabarovsky E.R. (2004) *RBSP3 (HYA22)* is a tumor suppressor gene implicated in major epithelial malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 4906–4911.
- 43. Knockaert M., Sapkota G., Alarcón C., Massagué J., Brivanlou A.H. (2006) Unique players in the BMP pathway: small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate Smad1 to attenuate BMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 11940–11945.

- 44. Rahman M.S., Akhtar N., Jamil H.M., Banik R.S., Asaduzzaman S.M. (2015) TGF- $\beta$ /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res.* **3**, 15005.
- 45. Wrighton K.H., Willis D., Long J., Liu F., Lin X., Feng X.H. (2006) Small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate the regulatory linker regions of Smad2 and Smad3 to enhance transforming growth factor-beta signaling. J. Biol. Chem. 281, 38365–38375.
- 46. Sun T., Fu J., Shen T., Lin X., Liao L., Feng X.H., Xu J. (2016) The small C-terminal domain phosphatase 1 inhibits cancer cell migration and invasion by dephosphorylating Ser(P)68-TWIST1 to accelerate TWIST1 protein degradation. *J. Biol. Chem.* 291, 11518–11528.
- 47. Liao P., Wang W., Li Y., Wang R., Jin J., Pang W., Chen Y., Shen M., Wang X., Jiang D., Pang J., Liu M., Lin X., Feng X.H., Wang P., Ge X. (2017) Palmitoylated SCP1 is targeted to the plasma membrane and negatively regulates angiogenesis. *Elife.* 6, e22058. https://doi.org/10.7554/eLife.22058
- Alonso A., Sasin J., Bottini N., Friedberg I., Friedberg I., Osterman A., Godzik A., Hunter T., Dixon J., Mustelin T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* 117, 699–711.
- Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. **307**, 1098–1101.
- 50. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., Mering C.V. (2019) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucl. Acids Res.* 47, D607–D613.
- Fernandes A.O., Campagnoni C.W., Kampf K., Feng J.M., Handley V.W., Schonmann V., Bongarzone E.R., Reyes S., Campagnoni A.T. (2004) Identification of a protein that interacts with the golli-myelin basic protein and with nuclear LIM interactor in the nervous system. *J. Neurosci. Res.* 75, 461–471.
- 52. Ma Y., Sekiya M., Kainoh K., Matsuda T., Iwasaki H., Osaki Y., Sugano Y., Suzuki H., Takeuchi Y., Miyamoto T., Yahagi N., Nakagawa Y., Matsuzaka T., Shimano H. (2020) Transcriptional co-repressor CtBP2 orchestrates epithelial-mesenchymal transition through a novel transcriptional holocomplex with OCT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **523**, 354–360.
- Roelofs A.J., Zupan J., Riemen A.H.K., Kania K., Ansboro S., White N., Clark S.M., De Bari C. (2017) Joint morphogenetic cells in the adult mammalian synovium. *Nat. Commun.* 8, 15040.
- 54. Huttlin E.L., Ting L., Bruckner R.J., Gebreab F., Gygi M.P., Szpyt J., Tam S., Zarraga G., Colby G., Baltier K., Dong R., Guarani V., Vaites L.P., Ordureau A., Rad R., Erickson B.K., Wühr M., Chick J., Zhai B., Kolippakkam D., Mintseris J., Obar R.A., Harris T., Artavanis-Tsakonas S., Sowa M.E., De Camilli P., Paulo J.A., Harper J.W., Gygi S.P. (2015) The BioPlex network: a systematic exploration of the human interactome. *Cell.* 162, 425–440.
- Ghosh A., Shuman S., Lima C.D. (2008) The structure of Fcp1, an essential RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol. Cell.* 32, 478–490.

- Muttigi M.S., Han I., Park H.K., Park H., Lee S.H. (2016) Matrilin-3 role in cartilage development and osteoarthritis. *Internat. J. Mol. Sci.* 17(4), 590. https://doi.org/10.3390/ijms17040590
- 57. Ghosh A., Shuman S., Lima C.D. (2008) The structure of Fcp1, an essential RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol. Cell.* **32**, 478–490.
- Thysen S., Cailotto F., Lories R. (2016) Osteogenesis induced by frizzled-related protein (FRZB) is linked to the netrin-like domain. *Lab. Invest. J. Techn. Meth. Pathol.* 96, 570–580.
- 59. Vlahakis N.E., Young B.A., Atakilit A., Hawkridge A.E., Issaka R.B., Boudreau N., Sheppard D. (2007) Integrin alpha9beta1 directly binds to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and contributes to VEGF-Ainduced angiogenesis. J. Biol. Chem. 282, 15187–15196.
- 60. Gebhardt C., Németh J., Angel P., Hess J. (2006) S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1622–1631.
- Otsubo K., Yoneda T., Kaneko A., Yagi S., Furukawa K., Chuman Y. (2018) Development of a substrate identification method for human scp1 phosphatase using phosphorylation mimic phage display. *Protein Peptide Lett.* 25, 76–83.
- Schwer B., Ghosh A., Sanchez A.M., Lima C.D., Shuman S. (2015) Genetic and structural analysis of the essential fission yeast RNA polymerase II CTD phosphatase Fcp1. *RNA*. 21, 1135–1146.
- Wang W., Liao P., Shen M., Chen T., Chen Y., Li Y., Lin X., Ge X., Wang P. (2016) SCP1 regulates c-Myc stability and functions through dephosphorylating c-Myc Ser62. *Oncogene*. 35, 491–500.
- 64. Onder T.T., Gupta P.B., Mani S.A., Yang J., Lander E.S., Weinberg R.A. (2008) Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* **68**, 3645–3654.
- 65. Ma L.M., Liang Z.R., Zhou K.R., Zhou H., Qu L.H. (2016) 27-Hydroxycholesterol increases Myc protein stability via suppressing PP2A, SCP1 and FBW7 transcription in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **480**, 328–333.
- 66. Qian W., Li Q., Wu X., Li W., Li Q., Zhang J., Li M., Zhang D., Zhao H., Zou X., Jia H., Zhang L. (2020) Deubiquitinase USP29 promotes gastric cancer cell migration by cooperating with phosphatase SCP1 to stabilize Snail protein. *Oncogene.* **39**, 6802–6815.
- 67. Reifenberger G., Ichimura K., Reifenberger J., Elkahloun A.G., Meltzer P.S., Collins V.P. (1996) Refined mapping of 12q13–q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res.* 56, 5141– 5145.
- Su Y.A., Lee M.M., Hutter C.M., Meltzer P.S. (1997) Characterization of a highly conserved gene (*OS4*) amplified with CDK4 in human sarcomas. *Oncogene*. 15, 1289–1294.
- 69. Ping Y., Deng Y., Wang L., Zhang H., Zhang Y., Xu C., Zhao H., Fan H., Yu F., Xiao Y., Li X. (2015) Identifying core gene modules in glioblastoma based on multilayer factor-mediated dysfunctional regulatory networks through integrating multi-dimensional genomic data. *Nucl. Acids Res.* 43, 1997–2007.

- Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J., Greenberg M.E. 1999. AKT promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 96, 857–868.
- Shamloo B., Usluer S. (2019) p21 in cancer research. *Cancers* (Basel). **11**(8), 1178. https://doi.org/10.3390/cancers11081178
- Fernández-Medarde A., Santos E. (2011) Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer.* 2, 344–358.
- Kashuba V.I., Pavlova T.V., Grigorieva E.V., Kutsenko A., Yenamandra S.P., Li J., Wang F., Protopopov A.I., Zabarovska V.I., Senchenko V., Haraldson K., Eshchenko T., Kobliakova J., Vorontsova O., Kuzmin I., Braga E., Blinov V.M., Kisselev L.L., Zeng Y.X., Ernberg I., Lerman M.I., Klein G., Zabarovsky E.R. (2009) High mutability of the tumor suppressor genes *RASSF1* and *RBSP3* (*CTDSPL*) in cancer. *PLoS One.* 4, e5231.
- Senchenko V.N., Anedchenko E.A., Kondratieva T.T., Krasnov G.S., Dmitriev A.A., Zabarovska V.I., Pavlova T.V., Kashuba V.I., Lerman M.I., Zabarovsky E.R. (2010) Simultaneous down-regulation of tumor suppressor genes *RBSP3/CTDSPL*, *NPRL2/G21* and *RASSF1A* in primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 10, 75.
- Chakraborty C., Roychowdhury A., Samadder S., Roy A., Mandal R.K., Basu P., Roychoudhury S., Panda C.K. (2016) Association of P16-RBSP3 inactivation with phosphorylated RB1 overexpression in basal-parabasal layers of normal cervix unchanged during CACX development. *Biochem. J.* 473, 3221–3236.
- 76. Sinha S., Singh R.K., Alam N., Roy A., Roychoudhury S., Panda C.K. (2008) Frequent alterations of *hMLH1* and *RBSP3/HYA22* at chromosomal 3p22.3 region in early and late-onset breast carcinoma: clinical and prognostic significance. *Cancer Sci.* 99, 1984–1991.
- 77. Ghosh A., Ghosh S., Maiti G.P., Sabbir M.G., Zabarovsky E.R., Roy A., Roychoudhury S., Panda C.K. (2010) Frequent alterations of the candidate genes *hMLH1*, *ITGA9* and *RBSP3* in early dysplastic lesions of head and neck: clinical and prognostic significance. *Cancer Sci.* **101**, 1511–1520.
- Mitra S., Mazumder Indra D., Bhattacharya N., Singh R.K., Basu P.S., Mondal R.K., Roy A., Zabarovsky E.R., Roychoudhury S., Panda C.K. (2010) RBSP3 is frequently altered in premalignant cervical lesions: clinical and prognostic significance. *Genes, Chrom. Cancer.* 49, 155–170.
- Sarkar S., Panda C.K. (2018) Preferential allelic deletion of *RBSP3, LIMD1* and *CDC25A* in head and neck squamous cell carcinoma: implication in cancer screening and early detection. *Cancer Biol. Therapy.* 19, 631– 635.
- Li J., Protopopov A., Wang F., Senchenko V., Petushkov V., Vorontsova O., Petrenko L., Zabarovska V., Muravenko O., Braga E., Kisselev L., Lerman M.I., Kashuba V., Klein G., Ernberg I., Wahlestedt C., Zabarovsky E.R. (2002) NotI subtraction and NotI-specific microarrays to detect copy number and methylation changes in whole genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 10724–10729.

- Kashuba V., Dmitriev A.A., Krasnov G.S., Pavlova T., Ignatjev I., Gordiyuk V.V., Gerashchenko A.V., Braga E.A., Yenamandra S.P., Lerman M., Senchenko V.N., Zabarovsky E. (2012) NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 13352– 13377.
- 82. Dmitriev A.A., Kashuba V.I., Haraldson K., Senchenko V.N., Pavlova T.V., Kudryavtseva A.V., Anedchenko E.A., Krasnov G.S., Pronina I.V., Loginov V.I., Kondratieva T.T., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Yenamandra S.P., Ignatjev I., Ernberg I., Klein G., Lerman M.I., Zabarovsky E.R. (2012) Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics*. 7, 502–513.
- Senchenko V.N., Kisseljova N.P., Ivanova T.A., Dmitriev A.A., Krasnov G.S., Kudryavtseva A.V., Panasenko G.V., Tsitrin E.B., Lerman M.I., Kisseljov F.L., Kashuba V.I., Zabarovsky E.R. (2013) Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. *Epigenetics.* 8, 409–420.
- 84. Dmitriev A.A., Rudenko E.E., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Gordiyuk V.V., Melnikova N.V., Stakhovsky E.O., Kononenko O.A., Pavlova L.S., Kondratieva T.T., Alekseev B.Y., Braga E.A., Senchenko V.N., Kashuba V.I. (2014) Epigenetic alterations of chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in clear cell renal cell carcinoma. *BioMed Res. Internat.* 2014, 735292.
- 85. Dmitriev A.A., Rosenberg E.E., Krasnov G.S., Gerashchenko G.V., Gordiyuk V.V., Pavlova T.V., Kudryavtseva A.V., Beniaminov A.D., Belova A.A., Bondarenko Y.N., Danilets R.O., Glukhov A.I., Kondratov A.G., Alexeyenko A., Alekseev B.Y., Klein G., Senchenko V.N., Kashuba V.I. (2015) Identification of novel epigenetic markers of prostate cancer by NotImicroarray analysis. *Dis. Markers.* **2015**, 241301. https://doi.org/10.1155/2015/241301
- Duncavage E., Goodgame B., Sezhiyan A., Govindan R., Pfeifer J. (2010) Use of microRNA expression levels to predict outcomes in resected stage I non-small cell lung cancer. J. Thoracic Oncol. Off. Publ. Internat. Assoc. Study Lung Cancer. 5, 1755–1763.
- Zheng Y.S., Zhang H., Zhang X.J., Feng D.D., Luo X.Q., Zeng C.W., Lin K.Y., Zhou H., Qu L.H., Zhang P., Chen Y.Q. (2012) MiR-100 regulates cell differentiation and survival by targeting RBSP3, a phosphatase-like tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 31, 80–92.
- Zhang L., He X., Li F., Pan H., Huang X., Wen X., Zhang H., Li B., Ge S., Xu X., Jia R., Fan X. (2018) The miR-181 family promotes cell cycle by targeting CTDSPL, a phosphatase-like tumor suppressor in uveal melanoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37, 15.
- Bernardi R., Pandolfi P.P. (2003) Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene*. 22, 9048–9057.
- 90. Giorgi C., Ito K., Lin H.K., Santangelo C., Wieckowski M.R., Lebiedzinska M., Bononi A., Bonora M., Duszynski J., Bernardi R., Rizzuto R., Tacchetti C., Pinton P., Pandolfi P.P. (2010) PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science*. 330, 1247–1251.

- Bernardi R., Guernah I., Jin D., Grisendi S., Alimonti A., Teruya-Feldstein J., Cordon-Cardo C., Simon M.C., Rafii S., Pandolfi P.P. (2006) PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature*. 442, 779–785.
- Lin Y.C., Lu L.T., Chen H.Y., Duan X., Lin X., Feng X.H., Tang M.J., Chen R.H. (2014) SCP phosphatases suppress renal cell carcinoma by stabilizing PML and inhibiting mTOR/HIF signaling. *Cancer Res.* 74, 6935– 6946.
- 93. Zhu Y., Lu Y., Zhang Q., Liu J.J., Li T.J., Yang J.R., Zeng C., Zhuang S.M. (2012) MicroRNA-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein. *Nucl. Acids Res.* 40, 4615–4625.

- Stellrecht C.M., Chen L.S. (2011) Transcription inhibition as a therapeutic target for cancer. *Cancers.* 3, 4170– 4190.
- 95. Morachis J.M., Huang R., Emerson B.M. (2011) Identification of kinase inhibitors that target transcription initiation by RNA polymerase II. *Oncotarget.* **2**, 18–28.
- 96. Dong P., Xiong Y., Yu J., Chen L., Tao T., Yi S., Hanley S.J.B., Yue J., Watari H., Sakuragi N. (2018) Control of PD-L1 expression by miR-140/142/340/383 and oncogenic activation of the OCT4-miR-18a pathway in cervical cancer. *Oncogene*. **37**, 5257–5268.
- 97. Matsuoka H., Ando K., Swayze E.J., Unan E.C., Mathew J., Hu Q., Tsuda Y., Nakashima Y., Saeki H., Oki E., Bharti A.K., Mori M. (2020) CTDSP1 inhibitor rabeprazole regulates DNA-PKcs dependent topoisomerase I degradation and irinotecan drug resistance in colorectal cancer. *PLoS One.* **15**, e0228002.

# SCP PHOSPHATASES AND TUMORIGENESIS

#### G. A. Puzanov<sup>1</sup> and V. N. Senchenko<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia \*e-mail: senvera@yandex.ru

Small SCP-phosphatases CTDSP1, CTDSP2 and CTDSPL carry out specific dephosphorylation of serine and threonine residues in protein molecules. These enzymes are involved in the regulation of the activity of RNA polymerase II at the stage of transition from initiation of transcription to elongation, in the regulation of the expression of neuron-specific genes, and in the activation of the key protein of the cell cycle pRb at the G1/S phase boundary. In addition, the substrates of SCP-phosphatases can be SMAD transcription modulators, AKT1 protein kinase - a regulator of the cell cycle, apoptosis and angiogenesis, TWIST1 and c-MYC transcription factors, Ras family proteins involved in signaling pathways that regulate cell growth and apoptosis, CDCA3, associated with cell division, inhibitor of cyclin-dependent kinases p21, protein of promyelo-cytic leukemia PML, which is involved in the regulation of tumor suppressors p53, PTEN, mTOR. Dysfunction or inactivation of SCP phosphatases leads to the development of various diseases, including cancer. The recent increase in interest in SCP-phosphatases is due to their oncosuppressive properties, as well as participation in the development of malignant tumors of various etiology and localization. This review discusses the properties of SCP-phosphatases and their role in oncogenesis. Understanding the functions of SCP phosphatases and their role in oncogenesis.

Keywords: SCP phosphatases, tumor suppressors, carcinogenesis

#### 542

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 577.29

# ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ В КЛЕТКЕ

© 2021 г. М. А. Капитонова<sup>*a*</sup>, О. А. Шадрина<sup>*a*, *b*</sup>, С. П. Королев<sup>*b*</sup>, М. Б. Готтих<sup>*a*, *b*, \*</sup>

<sup>а</sup>Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия <sup>b</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: gottikh@belozersky.msu.ru Поступила в редакцию 24.11.2020 г. После доработки 22.01.2021 г. Принята к публикации 22.01.2021 г.

Изменение внутриклеточной концентрации определенного белка в клетке считается одним из наиболее информативных подходов к изучению роли этого белка в жизнедеятельности клетки. Чаще всего с этой целью применяют методы генетического нокаута или нокдауна. Однако в некоторых случаях более информативным или удобным представляется воздействие непосредственно на уже синтезированный белок, причем это воздействие в идеале должно быть контролируемым во времени и обратимым. В настоящем обзоре проанализированы системы, позволяющие осуществлять контролируемую деградацию белков как путем их убиквитинирования с последующей протеасомной деградацией, так и за счет иных механизмов.

Ключевые слова: убиквитинирование, протеасомная деградация, ауксин, дегрон, индуцибельная деградация, оптогенетический подход

DOI: 10.31857/S0026898421040066

#### введение

Одним из наиболее информативных подходов к изучению роли отдельных белков в жизнедеятельности клетки считается изменение внутриклеточной концентрации этого белка. Уровень белка в клетке чаще всего снижают с помощью генетического нокаута или нокдауна. Однако полное "выключение" синтеза ключевых белков метаболических путей может вести к гибели клеток или существенному изменению их метаболизма, что значительно затрудняет изучение функциональной роли данных белков. Эту проблему можно решить с использованием методов, позволяющих в определенный момент времени обратимо снижать концентрацию исследуемого белка в клетке, например, путем его деградации. Для достижения контролируемой деградации часто используют модификацию эндогенных белков ауксин-индуцибельным дегроном (Auxin-Inducible Degron, AID). Принцип работы этого дегрона позаимствован у растений и приспособлен к исследованию механизмов процессов, протекающих в клетках нерастительного происхождения. Однако за последнее время появились и другие методы, позволяющие обратимо снижать внутриклеточный уровень различных белков в клеточных линиях и даже в модельных животных.

В настоящем обзоре рассмотрены возможности как системы AID, так и некоторых других систем, позволяющих осуществлять контролируемую деградацию белков путем их убиквитинирования и последующей протеасомной деградации либо за счет иных механизмов.

Сокращения: а.к. – аминокислотный остаток (при числе); AFB – auxin signaling F-box (ауксин-связывающий F-box-белок); AID – Auxin-Inducible Degron (индуцируемый ауксином дегрон); ARF – Auxin Response Transcription Factor (транскрипционный фактор, участвующий в ответе на ауксин); COI1 – Coronatine-insensitive protein 1 (белок 1, нечувствительный к коронатину); CRBN – Protein cereblon (цереблон); FBP – F-box protein (белок с F-box); FKBP – FK506 Binding Protein (белок, связывающий FK506); FLuc – firefly luciferase (люцифераза светлячка); GFP – Green fluorescent protein (зеленый флуоресцентный белок); IAA – indole-3-acetic acid (β-индолилуксусная кислота или гетероауксин); IAA17/AXR3 – Auxin-responsive protein IAA17 (белок IAA17, участвующий в ответе на ауксин); JA-Ile – (+)-7-iso-jasmonoyl-*L*-isoleucine ((+)-7изожасмоноил-*L*-изолейцин); JAZ – jasmonate ZIM-domain (ZIM-домен жасмоната); PROTAC – Proteolysis Targeting Chimera (домен, вызывающий деградацию); RBX1 – белок 1 с RING-box; ROC1 – regulator of cullins 1 (регулятор куллина 1); RFP – Red fluorescent protein (красный флуоресцентный белок); SCF – SKP, Cullin, F-box containing complex (комплекс, содержащий SKP, Cullin, F-box); SKP – S-phase kinase-аssociated protein (белок, ассоциированный с киназой S-фазы; TIR1 – Transport Inhibitor Response 1 (ауксин-связывающая убиквитинлигаза TIR1).



Рис. 1. Схема убиквитинирования в клетках млекопитающих. Уб – убиквитин.

#### убиквитинирование

Убиквитинирование – одна из важнейших посттрансляционных модификаций в клетках эукариот, в ходе которой происходит ковалентное присоединение одного или нескольких остатков убиквитина (белок 8.5 кДа) к аминокислотным остаткам в составе белков-мишеней. Убиквитин связывается с є-аминогруппами остатков лизина в молекулах большинства белков, но описано также присоединение убиквитина через их α-NH<sub>2</sub> концевые группы, а также остатки серина или треонина [1-3]. Возможно как моно-, так и полиубиквитинирование белков. При полиубиквитинировании молекулы убиквитина присоединяются друг к другу с образованием изопептидной связи между карбоксильной группой С-концевого остатка глицина одной молекулы и аминогруппой другой, уже связанной с белком-мишенью. Наличие остатков убиквитина способно определять внутриклеточную локализацию белка, усиливать или подавлять активность, препятствовать белок-белковым взаимодействиям, но самое главное — активировать протеолитическую деградацию белка при участии протеасомы 26S [1]. Долгое время считалось, что субстрат для его распознавания протеасомой должен быть полиубиквитинирован [4], а обнаруживаемые в клетке моноубиквитинированные белки участвуют в процессах, не связанных с протеолизом. Однако в последнее время выяснилось, что для гидролиза некоторых белков протеасомой достаточно их моноубиквитинирования или множественного моноубиквитинирования нескольких остатков лизина в составе одного белка [5]. Так, регулятор дифференцировки мышечных клеток РАХЗ подвергается протеолизу после моноубиквитиниро-

вания одного определенного остатка лизина [6], а для расщепления протеасомой предшественника фактора транскрипции NF-кВ – белка р105 – до активного фактора транскрипции (р50) необходимо моноубиквитинирование нескольких остатков лизина [7]. В состав убиквитина входят семь остатков лизина в положениях 6, 11, 27, 29, 33, 48 и 63. Показано, что положение лизина, участвующего в образовании связи между молекулами убиквитина в цепочке, определяет дальнейшую судьбу белка. Так, полиубиквитинирование за счет образования связей через К48 приводит к протеасомной деградации белка, в то время как лизин в положении 63 играет ключевую роль в координации таких процессов, как направленный эндоцитоз, воспаление, трансляция и репарация ДНК [1, 8]. Функции полиубиквитиновых цепочек, связанных через другие остатки лизина, смешанных и разветвленных цепочек. N-концевых линейных цепочек активно изучаются, но до сих пор остаются не до конца понятными [9, 10]. Интересно, что в некоторых случаях сигналами к протеасомной деградации оказались остатки убиквитина, присоединенные к остаткам, отличным от К48 [5]. Так, протеасома способна разрушать белки, содержащие разветвленные полиубиквитиновые цепи, присоединенные к К11/К48 или К48/К63 [11-13].

Убиквитинирование в клетках млекопитающих происходит в три стадии – стадии активации, конъюгации и лигирования (рис. 1) [1, 14].

 Активация. Убиквитин-активирующий фермент (E1) последовательно связывает АТР и убиквитин. После этого фермент E1 катализирует нуклеофильную атаку С-концевой карбоксильной группой на α-фосфат в АТР с образованием соответствующего ацилфосфата, а затем ацилирование этим ацилфосфатом остатка цистеина фермента E1 с образованием тиоэфирной связи между E1 и убиквитином.

2) Конъюгация. Посредством тио-переэтерификации убиквитин переносится на остаток цистеина убиквитин-конъюгирующего фермента (E2).

3) Лигирование. Убиквитинлигазы (Е3) обеспечивают образование изопептидной связи между лизином белка-мишени и С-концевым остатком глицина убиквитина.

Существуют два основных семейства убиквитинлигаз ЕЗ [1, 10]. Наиболее многочисленно семейство убиквитинлигаз, содержащих домен RING-finger (Really Interesting New Gene), – мультисубъединичных комплексов, выполняющих роль платформы, на которой в непосредственной близости связываются убиквитин-конъюгирующий фермент Е2 и белок-мишень, что позволяет эффективно переносить активированный фрагмент убиквитина от Е2 к мишени (именно этот вариант приведен на рис. 1). Второе семейство – это убиквитинлигазы НЕСТ-типа, содержащие так называемый домен HECT (Homologous to E6associated protein (E6-AP) Carboxyl Terminus). Для этих убиквитинлигаз характерен перенос активированного убиквитина с фермента Е2 на их внутренний остаток Cys, а затем уже сама убиквитинлигаза ЕЗ катализирует убиквитинирование белковой мишени.

Один из представителей RING-убиквитинлигаз – комплекс SCF (SKP, Cullin, F-box containing complex), состоит из вариабельного белка с F-box (FBP) и трех коровых субъединиц: куллина (CUL1), белка RBX1, содержащего цинксвязывающий RING-домен, и адаптерного белка SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1) [15]. Куллин образует основной структурный каркас комплекса SCF и связывает белок SKP1 с белком RBX1. Различные комбинации куллина и FBP могут генерировать порядка 100 типов убиквитинлигаз ЕЗ, которые нацелены на разные субстраты. Для обеспечения субстратной специфичности комплекса SCF важен белок FBP, поскольку именно он связывает белок-мишень независимо от комплекса [16]. Каждый FBP (например, белок SKP2) может распознавать несколько различных субстратов, причем характер распознавания зависит от их посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование или гликозилирование. После связывания целевого белка-мишени белок FBP за счет своего структурного мотива F-box связывается с белком SKP1 (компонент комплекса SCF), обеспечивая сближение белка-мишени и убиквитин-конъюгирующего фермента Е2. Связывание фермента E2 с комплексом SCF осуществляется через RING-домен. В результате остаток убиквитина переносится от фермента Е2 к белкумишени.

В заключение хотелось бы отметить, что процессы, аналогичные убиквитинированию в эукариотических клетках, протекают и в клетках прокариот. Так, обнаружен прокариотический убиквитин-подобный белок Pup (prokaryotic ubiquitin-like protein), присоединение которого к белкам служит сигналом к протеолизу протеасомами *Муcobacterium tuberculosis* [17].

## УБИКВИТИНИРОВАНИЕ В РАСТЕНИЯХ

В клетках растений полиубиквитинирование и последующая протеасомная деградация белков, содержащих специфические домены - дегроны, осуществляются с помощью гормонов ауксинов, из которых наиболее распространены гетероауксин (индолил-3-уксусная кислота, ІАА), и жасмонат изолейцина ((+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine, JA-Ile). Эти гормоны связываются с F-box-доменами белков TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) и COI1 (Coronatine-insensitive protein 1), cootBetственно, и способствуют их ассоциации с белкамимишенями, содержащими специфические мотивы дегрона. Белки TIR1 и COI1 входят в состав E3 убиквитинлигазного комплекса SCF, который вместе с убиквитин-конъюгирующим ферментом E2 катализирует полиубиквитинирование и последующую протеасомную деградацию содержащих дегрон белков [18-22]. Мишенями TIR1, связанного с ауксином, служат белки, содержащие AID, в то время как белок COI1, связанный с JA-Ile, нацелен на белки, содержащие дегроны JAZ [21, 23].

Для контролируемой деградации белков в нерастительных клетках чаще используется система AID, поэтому остановимся на ней более подробно. Гормон гетероауксин (рис. 2а) способен регулировать транскрипцию в растениях, стимулируя деградацию белков Aux/IAA, негативных регуляторов генной экспрессии [24]. Ауксин стимулирует связывание белков Aux/IAA с белком TIR1, который входит в состав комплекса ЕЗ убиквитинлигазы SCF<sup>TIR1</sup>. Изучение 29 белков Aux/IAA Arabidopsis, деградирующих в присутствии ауксина, показало, что все они состоят из четырех консервативных доменов. За связывание с убиквитинлигазой SCF<sup>TIR1</sup> отвечает домен II, который содержит консервативную аминокислотную последовательность, называемую AID [25]. Сродство комплекса SCF<sup>TIR1</sup> к AID-содержащим белкам резко возрастает именно в результате связывания ауксина с белком TIR1. Помимо F-box-домена белок TIR1 содержит также лейцин-богатые участки (LRR), по форме напоминающие подковообразные соленоиды. Карман связывания ауксина в белке TIR1 сформирован тре-



**Рис. 2.** Структура гетероауксина (*a*) и кармана для его связывания в белке TIR1 (*b*), петли (Loop) 2, 12 и 14 выделены желтым; PDBID 2P1P.

мя протяженными петлями, входящими в состав трех LRR (LRR 2, 12 и 14), которые названы Loop 2, Loop 12 и Loop 14 соответственно (рис. 26) [19]. Кроме того, в белке TIR1 в непосредственной близости от кармана связывания ауксина находится сайт связывания фитиновой (*D*-мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисдигидрофосфорной) кислоты [19], которая, вероятнее всего, служит структурным кофактором. Интересно, что сайт связывания фитиновой кислоты в TIR1 консервативен у белков AFB (auxin signaling F-box), которые, как и TIR1, принадлежат к семейству F-box-белков *Arabidopsis* [21], что свидетельствует о важной роли фитиновой кислоты в формировании структуры белков этого семейства.

Показано, что связывание ауксина с комплексом SCF<sup>TIR1</sup> не приводит к значительным изменениям конформации белка TIR1, а лишь усиливает взаимодействие комплекса с AID [19]. Однако такое взаимодействие возможно и в отсутствие фитогормона, что влечет за собой ауксиннезависимую деградацию белков, содержащих дегрон.

От ауксиннезависимой деградации могут предохранять белки семейства ARF (Auxin Response Transcription Factor) – факторы транскрипции, узнающие последовательность TGTCTC, встречающуюся в промоторах генов белков, участвующих в ауксинзависимой регуляции [26]. Растения Arabidopsis содержат более 10 различных белков ARF, каждый из которых распознает последовательность ТСТСТС и связывается с ней за счет консервативного ДНК-связывающего домена (120 аминокислот). Также в белках ARF есть домен PB1 (Phox and Bem1), который взаимодействует с доменами III и IV белков Aux/IAA. В результате белки Aux/IAA и ARF образуют гетеродимерный комплекс, в котором Aux/IAA защищены от взаимодействия с TIR1 и последующей ауксиннезависимой деградации [27, 28].

#### ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ АУКСИН-ИНДУЦИБЕЛЬНОГО ДЕГРОНА ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ НЕРАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В 2009 году систему AID успешно модифицировали для контролируемой деградации белков в нерастительных клетках [29]. Предположили, что добавление AID к белку-мишени (в качестве дегрона использовали полную последовательность белка IAA17/AXR3 из семейства Aux/IAA A. thaliana), а также экспрессия растительного белка TIR1 в клетках позволят запустить деградацию интересующего белка под действием фитогормона ауксина [29]. Из генома A. thaliana был выделен ген белка TIR1 (AtTIR1), который экспрессировали в клетках дрожжей Saccharomyces cerevisiae. С помощью иммунопреципитации показано, что полученный в результате белок TIR1 взаимодействует с белком CDC53, входящим в состав SCF-комплекса дрожжей. В эти клетки вводили последовательность гена зеленого флуоресцентного белка (GFP), модифицированного AID, а затем клетки обрабатывали ауксином. В результате интенсивность свечения GFP снижалась уже спустя 30 мин. Выяснилось также, что деградация GFP не зависит от того, к какому концу белка (С- или N-) присоединен дегрон. Огромным преимуществом этой системы является обратимость деградации: спустя 30 мин после удаления ауксина из среды свечение GFP начало восстанавливаться. Однако известно, что взаимодействие между AtTIR1 и белком, содержащим AID, стабильно при температуре от 4 до 25°С, а при 37°С сильно ослабевает [21], что связано с понижением стабильности AtTIR1 при температуре выше 25°С. Следовательно, чтобы применять AID-систему для деградации белков в клетках млекопитающих, культивируемых при температуре 37°С,



Рис. 3. Принцип работы AID-системы контролируемой деградации белка-мишени в клетках млекопитающих.

необходимо было повысить ее термостабильность. Для решения этой проблемы из растений, растущих в более жарком климате, выделили гены белков TIR1, а для использования в клетках млекопитающих выбрали продукт гена *TIR1* из *Oryza sativa* (osTIR1), взаимодействие которого с дегроном было устойчивым в широком интервале температур [29]. В результате получили систему индуцируемой деградации белков в клетках млекопитающих, состоящую из белка-мишени, меченного дегроном IAA17, белка osTIR1 и фитогормона ауксина (рис. 3).

Полученную систему опробовали для контролируемой деградации белка GFP-AID-NLS (NLS – nuclear localization signal, сигнал ядерной локализации), экспрессируемого в нескольких клеточных линиях: HeLa (клетки, полученные из раковой опухоли шейки матки), COS1 (клетки зеленой мартышки), СНОК1 (клетки китайского хомячка), NIH3T3 (эмбриональные клетки мыши), НЕК 293Т (эмбриональные клетки человека) и DT40 (В-клетки курицы) [29]. Концентрация белка-мишени при экспрессии в клетках osTIR1 и добавлении ауксина снижалась вплоть до 3% от концентрации в клетках дикого типа. В свою очередь, замена среды на среду без ауксина приводила к полному восстановлению уровня интересующего белка. Кроме того, экспрессия osTIR1 никак не сказывается на клеточном росте. В этой же работе система с использованием AID показала свою эффективность при снижении содержания эндогенного белка CENP-H (Centromere protein H) в клетках DT40 курицы.

Разработанную систему в дальнейшем успешно использовали на модельных организмах: дрожжах (Schizosaccharomyces pombe [30]), малярийном плазмодии (Plasmodium falciparum [31]), токсоплазме (Toxoplasma gondii [32]), дрозофиле (Drosophila melanogaster [33]) и нематодах (Caenorhabditis elegans [34]). В 2012 г. была подтверждена эффективность AID-системы для контролируемой деградации эндогенных белков (как ядерных, так и цитоплазматических) в клетках млекопитающих [35].

#### Модификация системы AID-дегрона

Уменьшение длины AID-дегрона IAA17. Длина дегрона IAA17, предложенного в [29], составляет 228 а.к., что затрудняет его встраивание в клеточные белки. Кроме того, присоединение достаточного большого белка IAA17 к белку-мишени может препятствовать его правильному фолдингу и нарушать функциональность. Как сказано выше, белки семейства Aux/IAA, к которому относится IAA17, состоят из четырех доменов, однако только второй домен абсолютно необходим для узнавания комплексом SCF<sup>TIR1</sup> и запуска деградации [20, 21]. Предприняты попытки определить минимальную длину AID, необходимую для успешной деградации целевого белка-мишени.

Проанализирована эффективность работы дегрона при укорачивании белка IAA17 до фрагментов 1–114 (115 а.к.), 31–114 (84 а.к.) и 71–114 (44 а.к., назван авторами AID\*) [36]. Модификация выбранного в качестве мишени белка RAD53 любым из указанных укороченных дегронов вызывала деградацию этого белка в клетках дрожжей, экспрессирующих osTIR1, при добавлении ауксина. Более короткие последовательности из IAA17 не приводили к деградации RAD53. Однако оказалось, что белок RAD53, меченный любым из дегронов, серьезно деградирует даже в отсутствие ауксина, причем деградация была сильнее в случае укороченных дегронов. Проблему нежелательной ауксиннезависимой деградации RAD53 удалось решить только путем модификации укороченного дегрона AID\* эпитопом 9myc. Поскольку белок RAD53 отвечает за правильное протекание репликации в клетках, снижение его уровня должно повышать чувствительность клеток к агентам, приводящим к сбою репликации, например, к гидроксимочевине и УФ-излучению. Оказалось, что только в случае RAD53<sup>AID\*-9myc</sup> чувствительность клеток к обоим агентам в отсутствие ауксина была сравнимой с чувствительностью клеток дикого типа, а при добавлении ауксина клетки вели себя как клоны с делетированным RAD53. В результате проделанной работы сделан вывод, что последовательность AID\*-9myc может использоваться для индукции ауксинзависимой деградации белков в культурах клеток [36].

Предложен и другой вариант укороченного дегрона — mini-AID 65—132 (68 а.к.) [37]. Присоединение нескольких конструкций mini-AID к белку Elg1 приводило к его деградации в клетках *S. cerevisiae* в присутствии ауксина. Интересно, что триплет такого мини-дегрона (3×mini-AID) вызывал даже более эффективную деградацию белка-мишени, чем полноразмерный дегрон IAA17. При этом не выявлено ауксиннезависимой деградации модифицированного дегроном белка Elg1. Возможно, этот нежелательный эффект, наблюдаемый в случае RAD53 [36], характерен не для всех белков, содержащих AID.

В 2016 г. укороченный дегрон впервые использовали для деградации белков в клетках млекопитающих [38]. Валидацию системы проводили на клетках НЕК 293Т, в которых дополнительно экспрессировали osTIR1, в качестве белка-мишени использовали GFP, к которому присоединяли либо полноразмерный дегрон ІАА17, либо его укороченный вариант – AID<sup>47</sup> (63–109, 47 а.к.). Интересно, что в клетках оба дегрона спонтанно отщепляются от GFP, однако полноразмерный дегрон ІАА17 отщепляется значительно быстрее, чем AID47, разработанный в [38]. Однако поскольку о подобном эффекте другие группы, использующие AID-систему, не сообщали, этот эффект сочли связанным исключительно с особенностями выбранной системы. Оказалось также, что

скорость отщепления дегрона зависит от локализации белка. Клетки трансфицировали векторами, кодирующими GFP-AID<sup>47</sup> и NLS-GFP-AID<sup>47</sup>. Отщепление AID<sup>47</sup> происходило одинаково эффективно в обоих случаях, но NLS-GFP-AID<sup>47</sup>, лока-лизующийся в ядре, расщеплялся быстрее. Тем не менее, далее AID<sup>47</sup> успешно использовали для деградации белков NANOG, CHK1 (Human checkpoint kinase 1), p53 и NOTCH1 (Neurogenic locus notch homolog protein 1) в стволовых клетках млекопитающих. Молификация белков AID<sup>47</sup> позволяла добиться практически полной их деградации vже через 20 мин после добавления аvксина. причем деградация была обратимой: через 2 ч после удаления ауксина из среды концентрация белка в клетках восстанавливалась до первоначального уровня.

Недавно был предложен еще более короткий вариант AID на основе белка IAA17 – smAID (74– 115, 42 а.к.) [39]. Присоединение smAID к эндогенному белку Ku70 человека приводило к его деградации в клетках HEK 293T, экспрессирующих оsTIR1. Однако в этом случае для полной деградации белка требовалось 2 ч после добавления ауксина, что может быть связано как с дополнительным уменьшением последовательности дегрона, так и с очень высоким содержанием белка Ku70 в клетках человека [40]. Надо отметить, что, как и в некоторых других исследованиях [36, 38], наблюдали ауксиннезависимую деградацию Ku70, хотя уровень ее был не очень значительным.

#### Подходы по предотвращению ауксиннезависимой деградации белков-мишеней, содержащих дегрон

Ауксиннезависимая деградация белков, модифицированных AID, может быть достаточно серьезной проблемой. Как сказано выше, TIR1 способен взаимодействовать с AID даже в отсутствие ауксина [19]. Несмотря на то, что это взаимодействие значительно слабее, чем при участии ауксина, оно достаточно для фоновой деградации белка. Так, в клеточных линиях HEK 293T, MCF-7 и DLD-1, экспрессирующих экзогенный TIR1, уровень AID-модифицированных белков даже в отсутствие ауксина составлял от 3 до 50% (в зависимости от белка) от уровня соответствующего белка в клетках дикого типа [41].

Один из вариантов решения данной проблемы – использование индуцируемых промоторов для контролируемой экспрессии гена белка TIR1. Так, уже в пионерской работе К. Nishimura и соавт. [29] белок TIR1 продуцировали с использованием индуцируемого галактозой промотора GAL. Однако для этого дрожжи необходимо выращивать на средах, содержащих галактозу в качестве основного ресурса углерода, что меняет метаболизм клеток, а потому может сказываться на ре-

зультатах изучения роли тех или иных белков в клеточном метаболизме [42]. Для решения этой проблемы разработана система β-est AID, в которой синтез белка osTIR1 контролируется промотором Z4EVpr, не требующим кардинальных изменений в среде, в которой растут клетки [42]. В этой системе использовали сконструированный фактор транскрипции ATF (Artificial Transcription Factor), состоящий из вирусного активатора транскрипции VP16, рецептора эстрадиола и четырех доменов типа цинковый палец. При добавлении в среду β-эстрадиола ATF проникает в клеточное ядро и активирует транскрипцию гена osTIR, связываясь с промотором Z4EVpr. В этой системе концентрация белка-мишени DCP1 (mRNA-Decapping enzyme 1) после инкубации с  $\beta$ -эстрадиолом, а затем с ауксином снижается до 13% от его уровня в необработанных клетках. Кроме того, были подобраны оптимальные условия добавления индукторов (предварительная инкубация с β-эстрадиолом в течение 60 мин и последующая 15-минутная инкубация с ауксином).

Для борьбы с аvксиннезависимой деградацией используют также белки ARF, которые регулируют деградацию в клетках растений, связываясь с белками Aux/IAA, содержащими AID, и препятствуя взаимодействию белка TIR1 с дегроном в отсутствие ауксина [26]. Наиболее интересными оказались факторы ARF16 и ARF25 из O. sativa [41]. Трансфекция клеток, экспрессирующих модифицированный дегроном белок-мишень И osTIR1, плазмидой, кодирующей домен PB1 белков ARF16 или ARF25, приводила к частичному восстановлению уровня белка-мишени. Напомним, что домен PB1 взаимодействует с доменами III и IV белков Aux/IAA и за счет этого мешает взаимодействию TIR1 с доменом II этих белков и последующей ауксиннезависимой деградации [27]. Важно отметить, что домен PB1 белка ARF16 не только более эффективно препятствует деградации белка-мишени в отсутствие ауксина, но и ускоряет ее в присутствии ауксина. При экспрессии домена PB1 белка ARF16 количество белкамишени спустя 1 ч после добавления ауксина снижается до уровня, недетектируемого вестернблотингом, в то время как полная деградация того же белка в отсутствие PB1-ARF16 не наступала даже спустя 3 ч после обработки ауксином. В этой же работе [27] показано, что для эффективного предотвращения фоновой ауксиннезависимой деградации необходимо сначала экспрессировать в клетках PB1-ARF16, а затем модифицировать белок-мишень AID и экспрессировать osTIR. Однако система с использованием PB1-ARF16 неприменима для укороченных AID, поскольку факторы ARF связываются с третьим и четвертым доменами полноразмерного AID [27, 28], а все применяемые укороченные дегроны не содержат этих доменов в своем составе.

Предложено и другое решение проблемы ауксиннезависимой деградации [43]. Можно заменить osTIR1 другим белком, содержащим домен F-box и эффективно связывающим AID, но при этом не вызывающим ауксиннезависимой деградации белка-мишени. В качестве такого белка выбрали AtAFB2 из A. thaliana, который, как и osTIR1, образует устойчивый комплекс с AID при 37°С. Установлено, что при использовании AtAFB2 вместо osTIR1 белки-мишени в гораздо меньшей степени подвержены ауксиннезависимой деградации. Подобран также новый укороченный дегрон (miniIAA7, 37-104, 67 а.к.), который лучше всего связывается с AtAFB2 и приволит к снижению концентрации белка-мишени уже спустя 1 ч после добавления ауксина. При этом неважно, на каком конце белка, С- или N-, расположен miniIAA7. Выяснилось, однако, что снижение уровня ядерных белков в присутствии AtAFB2 проходит менее эффективно, чем в случае osTIR1. Решить данную проблему предложено с помощью слабого сигнала ядерной локализации, который вводится на С-конец белка AtAFB2. Такая конструкция доступна в банке плазмид Addgene (#129717).

К преимуществам системы AtAFB2-miniIAA7 относятся ее применимость к различным линиям клеток, достаточно высокая скорость деградации (значительное снижение концентрации белка уже спустя 1 ч после добавления ауксина), отсутствие ауксиннезависимой деградации, а также возможность использовать укороченный AID [43].

# Комбинирование AID-системы с другими системами регуляции экспрессии белков

Применение AID-системы не всегда позволяет добиться полной деградации исследуемого белка. Так, например, AID-модификация белков MCM10 и DPB11, деградация которых должна приводить к остановке роста клеток дрожжей, поскольку они участвуют в инициации репликации ДНК и критически важны для перехода клетки в S-фазу, не приводила к желаемому эффекту при добавлении ауксина [44]. Соответственно сделан вывод о том, что только AID-системы недостаточно для полной деградации этих белков: для инициации репликации хватало той доли белков, которая оставалась интактной. Для дополнительного снижения уровня белка-мишени систему 3×mini-AID [37] скомбинировали с системой TET-Off [45]. Полученную систему Tet-OFF-AID назвали iAID (improved auxin-inducible degron) [44].

TET-Off — это система регуляции экспрессии белка-мишени, состоящая из трех компонентов: оператора TetO (последовательность, расположенная до промотора гена белка-мишени), транскрипционного активатора tTA и репрессора TetR. В отсутствие тетрациклина или его аналога доксициклина tTA связан с TetO и тем самым активирует транскрипцию с расположенного далее промотора, добавление же антибиотика нарушает связывание активатора с оператором и способствует связыванию репрессора, что останавливает транскрипцию гена белка-мишени [45].

Разработанную систему iAID применили к белкам МСМ10 и DPB11. С этой целью перед промоторами генов белков МСМ10 и DPB11, модифицированных AID с N- или С-конца, расположили оператор TetO [44]. Клетки дрожжей с такими модифицированными генами трансфицировали плазмидой, содержащей последовательности *tTA*, *TetR* и osTIR1, а затем обрабатывали ауксином и тетрациклином. В ходе отбора клеток. в которых действие системы iAID настолько снижало уровень белков МСМ10 и DPB11, что приводило к полной и необратимой остановке перехода клеток в S-фазу, выяснилось, что полное нарушение роста клеток происходило только при расположении дегрона на N-конце белка DPB11. Клеточные линии, содержащие либо модифицированный белок МСМ10, либо модифицированный по С-концу белок DBP11, все-таки входили в S-фазу.

Другой подход к повышению эффективности деградации белков-мишеней предложен в работе [46], в которой исследовали влияние белка МСМ4 на инициацию репликации ДНК в клетках дрожжей. Добавление ауксина приводило к снижению уровня белка, модифицированного полноразмерным AID, но рост клеток при этом не останавливался. По-видимому, причиной недостаточной эффективности системы могла быть низкая концентрация белка AtTIR1 в ядрах клеток или непрочный контакт между AtTIR1 и компонентом SCF-комплекса – белком SKP1. Чтобы определить истинную причину, сконструировали два вектора – один для экспрессии белка AtTIR1, слитого с сигналом ядерной локализации, а второй – AtTIR1, слитого с белком SKP1. Этими плазмидами трансфицировали клетки, в которых белок MCM4 был модифицирован AID, и наблюдали более эффективную остановку клеточного роста при использовании плазмиды SKP1-AtTIR1. Таким образом, основной причиной отсутствия нарушения репликации был слабый контакт между белками SCF<sup>TIR1</sup>-комплекса. приволяший к нарушению убиквитинирования и последующей деградации белка МСМ4. Тем не менее, введение сигнала ядерной локализации увеличивало, пусть и менее эффективно, деградацию белка. Поэтому для экспрессии белка TIR1 было решено использовать конструкцию SKP1-AtTIR1-NLS, чтобы повысить эффективность работы AID, скомбинировав два подхода: усилить взаимодействие между SKP1 и AtTIR1 и увеличить концентрацию AtTIR1 в ядре. Эта система, протестированная на нескольких десятках белков, в большинстве слу-

чаев оказалась эффективной, но в случае белка МСМ10 и еще нескольких она не позволяла снижать концентрацию мишени настолько. чтобы это сказывалось на клеточном росте. Предположили, что эта проблема может быть обусловлена синтезом нового белка в период активации деградации. Поэтому систему решили доработать, заменив эндогенный промотор генов исследуемых белков-мишеней на промотор P<sub>nmt81</sub>, репрессируемый тиамином. Добавление тиамина приводит к остановке транскрипции, и введение ауксина запускает деградацию уже синтезированного белка. В такой системе концентрация исследуемых белков снижалась до уровня, не детектируемого Вестерн-блотингом, и рост клеток прекращался, что свидетельствует об эффективности полученной системы, названной off-AID [46].

#### ДРУГИЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДЕГРАДАЦИИ БЕЛКОВ

#### Система с использованием дегрона JAZ

Как уже отмечено, помимо ауксинов в процессе индуцируемой гормонами деградации белков в растениях принимает участие JA-Ile (рис. 4a) [18, 22, 47]. Сигнальный путь с участием JA-Ile включает убиквитинирование специфических белковмишеней комплексом SCF<sup>COI1</sup> и их последующую деградацию 26S протеасомой. В данном случае в состав ЕЗ убиквитин-лигазного комплекса SCF в качестве белка, содержашего домен F-box, входит СОІ1. Мишенью комплекса SCF<sup>COI1</sup> служат так называемые JAZ-белки (jasmonate ZIM-domain proteins) [22, 48]. Все ЈАZ-белки содержат центральный высококонсервативный ZIM-домен и С-концевую консенсусную последовательность SLX<sub>2</sub>FX<sub>2</sub>KRX<sub>2</sub>RX<sub>5</sub>PY, называемую Jas-мотив. Показано, что именно Jas-мотив важен для связывания JAZ-белков с доменом F-box белка COI1, причем замена всего двух аминокислот – R205 и R206, в Jas-мотиве белка JAZ1 нарушает это взаимодействие [49]. Действием, аналогичным действию JA-Ile, обладает фитотоксин коронатин, продуцируемый патогенной бактерией Pseudomonas syringae [50], который, как и JA-Ile, стимулирует связывание JAZ-белков с COI1 [49]. Коронатин обладает структурным сходством с JA-Ile (рис. 4б), оба эти соединения связываются в одном структурном кармане белка COI1 и их связывание стабилизируется в присутствии Jas-мотива JAZ-белков. Подчеркнем, что в отличие от ауксина, который взаимодействует только с доменом F-box белка TIR1, коронатин и JA-Ile связываются уже с комплексом СОІ1/ЈАΖ. Причем для образования стабильного комплекса JA-Ile(коронатин)/JAZ/COI1 достаточно пептида, соответствующего последовательности (Glu200–Val220) из Jas-мотива белка JAZ1 [51].

Показано, что JA-Ile-зависимое взаимодействие белков COI1 и JAZ1 возможно и в клетках дрожжей, т.е. для него не нужны другие растительные белки [49]. Тем не менее, эта система не нашла столь широкого применения для направленной деградации белков в нерастительных клетках, как система AID. Сравнение двух систем показало, что система JAZ-дегрона может использоваться для направленной деградации белков в ядрах клеток млекопитающих под действием коронатина [38]. Однако для этого необходимо модифицировать белок-мишень 33-звенным пептидом из JAZ-дегрона риса (OsJAZ<sup>33</sup>), а в качестве белка F-box использовать химерный белок osTIR1<sup>F-box</sup>-osCOI1B<sup>LRR</sup>. Таким образом, эта система оказалась более сложной в использовании, чем AID-система.

#### Система dTAG

Система dTAG (degradation tag) деградации белка-мишени также основана на процессе убиквитинирования, но при этом использует механизм инициации убиквитинирования, существующий в клетках животных [52]. Помимо SCFкомплекса, функции лигазы ЕЗ способен исполнять белковый комплекс, состоящий из цереблона (CRBN), куллина-4А (CUL4A), белка DDB1 (DNA Damage-Binding Protein), связывающего поврежденную ДНК, и белка RBX1/ROC1 (RING-box protein 1/regulator of cullins 1), содержащего домен RING-box для связывания с куллином [53]. Для привлечения этого комплекса к белку-мишени разработана специальная метка, представляющая собой белок FKBP12<sup>F36V</sup>, полученный методами белковой инженерии из FKBP12. Белки семейства FKBP (FK506 Binding Protein) обладают пролилизомеразной активностью и выполняют функцию шаперонов, способствуя правильному фолдингу пролинсодержащих белков. Кроме того, получен синтетический низкомолекулярный лиганд dTAG-13 (рис. 5*a*), с которым одновременно могут связаться FKBP12<sup>F36V</sup> и белок цереблон. Предполагалось, что добавление dTAG-13 к культуре клеток, в которых белокмишень слит с белком FKBP12<sup>F36V</sup>, должно способствовать связыванию с данным белком ЕЗ лигазы, в состав которой входит цереблон, и убиквитинированию мишени с последующей деградацией (рис. 5б). Предварительно показано, что в присутствии dTAG-13 мутант FKBP12<sup>F36V</sup> деградирует, а FKBP12 дикого типа деградации не подвергается.

Систему dTAG протестировали на культуре клеток HEK 293T и показали, что деградация бромодоменсодержащего белка 4 (BRD4), слитого с белком FKBP12<sup>F36V</sup>, наблюдалась уже через 1 ч по-



**Рис. 4.** Структура жасмонат изолейцина (*a*) и коронатина (*б*).

сле добавления 500 нМ dTAG-13. Кроме того, эта система проверена на нескольких десятках белков в линии клеток MV4-11 миелоидного лейкоза. Деградация всех исследуемых белков происходила через 2—4 ч, причем в некоторых случаях ее эффективность была достаточной для подавления клеточного роста [52].

К преимуществам системы dTAG по сравнению с AID-системой относится отсутствие необходимости экспрессии в животных клетках компонентов растительной убиквитинлигазы, таких как белок TIR1, поскольку система dTAG изначально основана на процессе убиквитинирования в клетках животных. Важно, что эффективность системы dTAG показана и на мышах, на которых AID-систему не применяли. В костный мозг мышей вводили клетки, экспрессирующие люциферазу, слитую с белком FKBP12<sup>F36V</sup> (luc-FKBP12<sup>F36V</sup>), и уже через 4 ч после введения dTAG-13 наблюдали значительное снижение уровня биолюминесценции, что указывает на эффективное разрушение белка luc-FKBP12<sup>F36V</sup>. Через 28 ч после обработки dTAG-13 биолюминесценция восстанавливалась до уровня в контроле [52].

#### Системы HaloTag и HaloPROTAC

Система HaloTag отличается от описанных выше тем, что в ней используется принцип убиквитиннезависимой деградации белков. HaloTagметка была разработана для визуализации белков-мишеней в клетке, их иммобилизации, а также выявления клеточных партнеров [54]. Эта метка представляет собой модифицированную галоалкандегалогеназу, способную реагировать с синтетическим лигандом, содержащим хлоралкильный фрагмент, присоединенный к флуоресцентным красителям, биотину, аффинным меткам и т.д. Образование ковалентной связи между белком и хлоралкильным фрагментом происходит быстро и



Рис. 5. Структура низкомолекулярного лиганда dTAG-13 (a) и принцип работы системы dTAG (b).

CRR

в физиологических условиях, приводя в результате к образованию белка, содержащего необходимую метку (HaloTag). Использовать HaloTag для деградации белков предложили в работе [55]. Предположили, что модификация поверхности белка-мишени HaloTag-меткой, содержащей гидрофобный лиганд, может привести к его деградации, поскольку клетка будет воспринимать белок, модифицированный такой гидрофобной меткой, как неправильно свернутый и подлежащий уничтожению [56, 57] (рис. 6а). И действительно, 5 из 30 синтезированных гидрофобных лигандов [55] вызывали разрушение модельной мишени (люциферазы, слитой с HaloTag (Luc-HaloTag), экспрессированной в клетках НЕК 293Т), причем наиболее эффективным оказался

Уб

RBX1

NEDD8

CUL4A

лиганд HyT13 (рис. 66). Изучение кинетики деградации Luc-HaloTag показало, что белок не детектировался в клетках через 8 ч после добавления к ним 100 нМ лиганда HyT13.

Уб

FKBP12F36V

Белок-

мишень

Систему HaloTag:HyT13 также успешно применяли для деградации мембранных белков, белков эмбрионов *Danio rerio*, а также мутантного белка H-RasG12V в злокачественной опухоли, привитой мышам. Показано, что лиганд HyT13 может эффективно проникать в клетки и ткани организма и направлять меченные HaloTag белки на деградацию [55]. Позднее систему HaloTag с другими лигандами успешно использовали для направленной деградации белков CREB1 (responsive element binding protein 1) и с-Jun в культурах клеток [58].



Рис. 6. Принцип работы системы HaloTag (a) и структура лиганда HyT13 (б).

В дальнейшем в системе HaloTag предложили использовать молекулы PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimera) – бифункциональные низкомолекулярные лиганды, которые могут рекрутировать определенные ЕЗ лигазы к нужному белку (подробно система PROTAC будет рассмотрена ниже) [59]. Синтезирована серия хлоралкилсодержащих лигандов PROTAC (HaloPROTAC), способных связываться с усовершенствованной версией HaloTag - HaloTag7 и опухолевым супрессором VHL, который в комплексе с элонгинами С и В и куллином выполняет роль ЕЗ лигазы и способен активировать деградацию белка путем его убиквитинирования. Таким образом, полученные лиганды, связываясь одновременно с белками, меченными HaloTag7, и VHL, могут активировать деградацию меченых белков (рис. 7*a*). Самым эффективным оказался HaloPROTAC3 (рис. 76), добавление которого к клеткам НЕК 293Т, экспрессирующим модельный белок-мишень GFP-HaloTag7, приводило к снижению его концентрации на 90% от начального уровня.

Сравнение уровня деградации белка GFP-HaloTag7 под действием HaloPROTAC3 и HyT36 (триплет наиболее эффективного гидрофобного лиганда HyT13 [55]) показало более высокую эффективность системы HaloPROTAC (при концентрации HaloPROTAC3 19  $\pm$  1 нМ максимальная степень деградации равна 90  $\pm$  1%, а при концентрации HyT36 134  $\pm$  7 нМ – 56  $\pm$  1%) [59].

Систему HaloPROTACs успешно применили для деградации эндогенных белков SGK3 и VPS34, модифицированных меткой HaloTag7, с помощью технологии CRISPR/Cas9. В этом случае использовали усовершенствованную молекулу HaloPROTAC-E — хлоралкилсодержащий высокоаффинный лиганд белка VHL (VH298), вызывающий ~50%-ную деградацию белка SGK3, меченного HaloTag7, уже за 30 мин и ~95%-ную деградацию через 48 ч [60].

Некоторые компании ("Promega", "GeneCopoeia") предлагают коммерческие наборы и векторы, позволяющие быстро и эффективно вводить метку HaloTag на C- и N-концы различных белков-мишеней. Однако стоит учитывать, что любой хлоралкилсодержащий лиганд ковалентно присоединяется к метке HaloTag, а значит, деградацию модифицированного им белка невозможно остановить, просто удалив этот лиганд из среды, как в случае деградации, индуцируемой ауксином. Именно по этой причине появление белков-мишеней детектируют не раньше, чем через 24 ч после удаления лигандов, когда в клетках успевают синтезироваться новые порции этих белков [55, 59]. Кроме того, как в системе HaloTag, так и HaloPROTAC к эндогенным белкам для их деградации необходимо присоединить достаточно большой белок (FKBP12<sup>F36V</sup> или HaloTag), длина которого значительно превышает длину укороченных вариантов AID, и который может повлиять на фолдинг и функциональность исследуемых белков-мишеней.

#### Система PROTAC

Как отмечено выше, при разработке системы HaloTag использовали молекулы PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimera), которые состоят из лиганда (чаще всего низкомолекулярного ингибитора) белка-мишени и лиганда убиквитинлигазы E3, которые ковалентно соединены линкером



Рис. 7. Принцип работы системы HaloPROTAC (a) и структура лиганда HaloPROTAC3 (б).

длиной 5-15 атомов. В результате связывания PROTAC одновременно с белком-мишенью и убиквитинлигазой ЕЗ эти два белка сближаются, что обеспечивает убиквитинирование мишени и ее последующую деградацию 26S протеасомой [61]. Систему PROTAC впервые предложили в работе [62], в которой показана возможность направленного убиквитинирования метионин-аминопептидазы-2 (MetAP-2) комплексом SCF (Skp1-Cullin-F-box), содержащим белок Hrt1 (RING-H2 protein Hrt1). Белок MetAP-2 способен ковалентно связывать ингибитор ангиогенеза овалицин, поэтому синтезировали бифункциональное соединение Protac-1, один домен которого состоял из овалицина, а другой содержал фосфопептид IkBa, распознаваемый F-box-белком b-TRCP. Показано, что молекула Protac-1 успешно связывает белки SCF/b-TRCP и MetAP-2, что приводит к убиквитинированию и протеасомной деградации последнего. При этом деградации подвергается только белок MetAP-2, содержащий остаток Protac-1.

Значительным прогрессом в развитии технологии PROTAC стало создание в 2008 г. первого бифункционального соединения, содержащего в качестве обоих лигандов (мишени и убиквитинлигазы ЕЗ) только низкомолекулярные соединения [63]. Новая молекула PROTAC состояла из лиганда рецептора андрогенов (SARM) и нутлина – лиганда белка MDM2 (mouse double minute 2 homolog), связанных линкером на основе полиэтиленгликоля. В этой системе белок MDM2 функционирует как убиквитинлигаза ЕЗ. Новый PROTAC эффективно привлекал рецептор андрогенов к белку MDM2, что приводило к убиквитинированию рецептора и его последующей деградации протеасомой.

К настоящему времени разработаны молекулы PROTAC, в которых используются низкомолекулярные лиганды не только MDM2, но и таких убиквитинлигаз E3, как онкосупрессор VHL (Von Hippel-Lindau) [64], белки-ингибиторы апоптоза IAP (inhibitor of apoptosis proteins) [65], цереблон [66]. Технология PROTAC активно развивается: разрабатываются новые лиганды белков-мишеней разного типа, оптимизируется структура линкеров, определяются условия, позволяющие наиболее эффективно формировать тройной комплекс белка-мишени/PROTAC/убиквитинлигазы в различных клетках и животных моделях. Для оптимизации структуры PROTAC активно используют данные рентгеноструктурного анализа комплексов белков с их лигандами [67, 68], а также компьютерный докинг [69].

Первый положительный эффект от использования молекул PROTAC in vivo получили в 2013 г., когда с помощью контролируемой деградации меченных PROTAC белков удалось подавить развитие раковой опухоли в мышиной модели [70]. С тех пор получены многочисленные данные об успешном использовании in vitro и in vivo молекул PROTAC, нацеленных на различные мишени, причем надо особо отметить, что технология PROTAC оказалась особенно удобным инструментом разрушения белков, вовлеченных в развитие онкологических заболеваний [71, 72]. К настоящему времени удалось создать молекулы PROTAC, способные не только эффективно индуцировать протеолиз мишеней, но и обладающие хорошей фармакокинетикой и фармакодинамикой. В результате две молекулы проходят сейчас клинические испытания в качестве противоопухолевых препаратов [72, 73]. Необходимо отметить некоторые достаточно серьезные преимущества молекул PROTAC по сравнению с традиционными низкомолекулярными ингибиторами ферментов, вовлеченных в развитие онкологических заболеваний. Во-первых, молекула PROTAC способна катализировать деградацию нескольких молекул белка-мишени. Благодаря такому каталитическому механизму действия, для достижения желаемого фармакологического эффекта требуются значительно более низкие концентрации PROTAC, чем обычных ингибиторов. Еще одно преимущество PROTAC состоит в том, что они могут использоваться для преодоления лекарственной устойчивости, возникающей из-за мутаций в белках-мишенях в результате стандартной химиотерапии [74]. Более широкое распространение этой технологии ограничивается главным образом тем, что для каждого нового белка-мишени необходимо подбирать свой лиганд. Кроме того, содержание убиквитинлигаз ЕЗ может сильно варьировать в разных клетках, что необходимо учитывать при создании молекул PROTAC, нацеленных на деградацию определенного белка в клетках определенного типа.

#### Система SMASh

Еще одна система, позволяющая осуществлять контролируемую деградацию белков, названа SMASh (Small Molecule-Assisted Shutoff) [75]. Эта система, как и система HaloTag, использует принцип убиквитиннезависимой деградации белков. Суть ее состоит в том, что к белку-мишени присоединяется дегрон, который в отсутствие соответствующего ингибитора сам отшепляет себя. оставляя в клетке интактный белок. В качестве такого дегрона использован протеазный домен NS3pro неструктурного белка 3 (NS3) вируса гепатита С, слитый с белком NS4A этого же вируса (NS3pro-NS4A). Если в среде отсутствуют ингибиторы протеазной активности NS3, то модуль NS3pro-NS4A сразу по окончании трансляции отщепляется от белка-мишени и подвергается деградации, а сам белок-мишень остается в интактном состоянии (рис. 8). В присутствии же любого ингибитора сериновой протеазы NS3, например асунапревира, отщепление блокируется, и исследуемый белок, слитый с дегроном NS3pro-NS4A, подвергается деградации.

Для объяснения такого необычного свойства дегрона NS3pro-NS4A необходимо обратиться к функциональной роли белка NS4A в репликации вируса гепатита С. В ходе репликации синтезируемый полипептид NS3-4А расщепляется на два отдельных белка благодаря активности протеазного домена NS3. В результате N-конец белка NS4A формирует гидрофобную α-спираль, которая встраивается в мембрану эндоплазматического ретикулума. Позиционирование полипептида NS3-4A в активном центре протеазы NS3 обеспечивается за счет хеликазного домена NS3 [76]. Однако в конструкции NS3pro-NS4A, использованной в системе SMASh, отсутствует хеликазный домен NS3, поэтому NS3pro-NS4A не расщепляется, и свободный N-конец NS4A не образуется. Из-за этого NS4A не может встроиться в мембрану, при этом его гидрофобная структура распознается клетками как дегрон и уничтожается вместе со слитым с ним белком.

Доработка системы SMASh позволила модифицировать белки-мишени как с N-, так и с С-конца, а также повысить эффективность отщепления дегрона в отсутствие асунапревира. При использовании в качестве мишени желтого флуоресцентного белка (YFP), слитого с дегроном NS3pro-NS4A, 50%-ная эффективная концентрация (EC<sub>50</sub>) асунапревира, измеренная по уменьшению флуоресценции YFP, составляла приблизительно 1 нМ, что сравнимо с его EC<sub>50</sub> в тестах по ингибированию репликона вируса.



Рис. 8. Схема работы системы индуцибельной деградации белка, содержащего метку SMASh.

Этот результат показывает, что связывание асунапревира с протеазой NS3 не изменяется в конструкции SMASh. Примечательно, что YFP не детектировался при концентрации асунапревира 1.5 мкМ [75], при которой он не проявляет активности против клеточных протеаз и не обладает цитотоксичностью [77]. Кроме того, полученная система деградации белка действительно обратима: уже спустя 1 ч после удаления асунапревира из среды концентрация белка-мишени восстанавливалась до исходного уровня. Система показала свою эффективность в снижении уровня белкамишени как в животных клетках (НЕК 293Т, клетки кортико-гиппокампальной системы крыс и кортикальные нейроны мышей), так и в клетках дрожжей [75].

Преимущество системы SMASh перед системой AID заключается в отсутствии необходимости продуцировать дополнительные белки. Система лишена и такого недостатка, как описанная индукторнезависимая деградация, которая часто наблюдается в случае AID. К преимуществам этой системы относится и то, что метка NS3pro-NS4А удаляется сразу после синтеза белка в отсутствие блокаторов протеаз, и никак не влияет на функции и фолдинг белка-мишени. Возможно, именно по этим причинам систему SMASh начали активно использовать для направленной деградации вирусных и клеточных белков [78-80]. Тем не менее, возможности этой системы, по-видимому, ограничены активно экспрессируемыми белками. Если исходить из механизма деградации белков с меткой NS3pro-NS4A, то становится понятным, что белок можно разрушить, только если он синтезируется в присутствии ингибитора протеазы NS3pro, если же трансляция уже завершилась и дегрон отщепился, то добавление ингибитора не приведет к разрушению белка.

#### Оптогенетический подход к деградации белков

Все описанные выше методы основаны на использовании химических соединений, индуцирующих деградацию соответствующим образом меченых белков (ауксин, dTAG, PROTAC) или, наоборот. препятствующих ей (асунапревир). Принципиально иной подход основан на индукции деградации белка, содержащего специально сконструированный светочувствительный домен, при облучении светом определенной длины волны. Этот подход назван оптогенетическим по аналогии с методом изучения работы нервных клеток, основанным на внедрении в их мембрану белков-опсинов, реагирующих на возбуждение светом [81]. В большинстве работ в качестве светочувствительного домена используется домен LOV (Light-Oxygen-Voltage) из фоторецепторных белков растений [82-86]. Этот домен состоит из корового домена, связывающего FMN, и Ja-спирали на С-конце, которая в темноте ассоциирована с коровым доменом. При облучении синим светом остаток цистеина из корового домена образует ковалентный аддукт с возбужденным FMN. Это вызывает конформационные изменения в коре, за которыми следует диссоциация и разворачивание Ја-спирали [87]. Если к С-концу Ја-спирали присоединен какой-либо дегрон, то весь домен LOV может подвергаться протеасомной деградации. Если же домен LOV присоединен к исследуемому белку-мишени, то облучение синим светом вызывает деградацию этого белка (рис. 9).

В первой работе, в которой предложено использовать оптогенетический подход к деградации белков, в качестве дегрона была выбрана последовательность орнитиндекарбоксилазы (ODC) мыши [82]. Этот дегрон индуцирует убиквитиннезависимую протеасомную деградацию, если он присоединен к С-концу белка. Он состоит из неструктурированного пептида длиной 37 а.к., содержащего



Рис. 9. Схема работы оптогенетического подхода к деградации белков.

цистеин-аланиновый мотив, который участвует в распознавании протеасомой и поэтому важен для деградации [88]. Структурно-функциональные исследования показали, что для эффективной деградации красного флуоресцентного белка (RFP), к С-концу которого присоединен домен LOV с ОDС-дегроном, достаточно дегрона из 23 а.к. [82]. В качестве домена LOV использовали домен LOV2 фототропина A. thaliana (AtLOV2). Изучение кинетики деградации белка RFP-AtLOV2-ODC(23) показало, что после 2 ч облучения синим светом ( $\lambda = 470$  нм) в клетках остается не более 10% белка, а время полудеградации составляет 38 мин. После помещения клеток в темноту белок RFP-AtLOV2-ODC(23) появлялся через 1 ч. Такой же подход с использованием AtLOV2-ODCдомена впоследствии применяли для деградации других белков [84, 86].

Предложен и другой модуль [83], обеспечивающий деградацию белка при облучении синим светом, – домен LOV2 из фототропина 1 Avena sativa (AsLOV2), к С-концу которого присоединен пептид RRRG, вызывающий протеасомную деградацию белков в клетках млекопитающих [89]. Этот модуль назван доменом B-LID (Blue-Light Inducible Degradation). Домен B-LID использовали и в комбинированном подходе, который позволяет при облучении клеток синим светом ( $\lambda =$ = 460 нм) одновременно подавлять активность промотора гена, кодирующего целевой белок, и вызывать протеасомную деградацию этого белка [85]. Созданная система, названная Blue-OFF, состояла из репрессора KRAB-EL222 и модуля B-LID, обеспечивающего деградацию белка. Оба компонента содержали светочувствительные домены LOV. Облучение способствовало димеризации и связыванию фоточувствительного транскрипционного фактора EL222 со специфической последовательностью ДНК; в результате транскрипция с промотора прекрашалась под действием репрессорного домена KRAB (Krüppel associated box), входящего в состав модуля KRAB-EL222. Эффективность системы Blue-OFF исследована с использованием люциферазы светлячка (firefly luciferase, FLuc) в качестве белка-мишени. Работу регулятора транскрипции KRAB-EL222 анализировали, используя ген люциферазы под

контролем промотора SV40, за которым располагалась последовательность (С120)5, связывающая KRAB-EL222. К С-концу люциферазы с целью контроля эффективности фотоиндуцируемой деградации присоединен модуль B-LID. После облучения клеток НЕК-293Т, экспрессирующих люциферазу FLuc-B-LID, светом с длиной волны 460 нм в течение 8 ч уровень люциферазы снижался до 10% от исходного при наличии обоих модулей (KRAB-EL222 и B-LID) и только на 50% в присутствии одного из них. Таким образом показана эффективность работы системы Blue-OFF. Следует добавить, что уровень FLuc-B-LID, сниженный в результате облучения, восстанавливался, когда клетки помещали на 12 ч в темноту. Аналогичные результаты получены и на других клеточных линиях (HeLa, CHO-K1, NIH/3T3 и COS-7).

Понятно, что оптогенетический подход к контролируемой деградации белков имеет и свои преимущества, и свои недостатки по сравнению с методами, использующими химические индукторы. То, что индукция деградации белка, содержашего домен LOV. происходит под действием света и не требует добавления к клеткам химического агента, который потенциально может влиять на их метаболизм, является несомненным преимуществом этого подхода. Однако использование именно синего света ограничивает применение оптогенетического подхода в основном клеточными культурами. Применение этого подхода in vivo достаточно проблематично, поскольку синий свет не способен проникать через кожные покровы и, более того, вызывает окислительный стресс [90]. Дополнительно отметим, что все разработанные к настоящему времени варианты оптогенетического подхода используют убиквитиннезависимую деградацию белков-мишеней.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные в последние годы методы воздействия на геном или мРНК позволяют определить роль тех или иных клеточных компонентов и, в первую очередь, белков, в различных клеточных процессах. Однако в некоторых случаях более информативным или удобным представляется воздействие непосредственно на экспрессиро-

ванный белок, причем в идеале это воздействие должно быть контролируемым во времени и обратимым. В данном обзоре мы рассмотрели основные подходы к контролируемой деградации белков в клетке и постарались оценить их достоинства и недостатки. Некоторые из этих подходов (dTAG, HaloTag) показали свою эффективность не только в культурах клеток, но и на животных моделях. Несомненно, перспективен подход с использованием молекул PROTAC, который позволил вплотную подойти к созданию нового типа противоопухолевых препаратов. Два препарата PROTAC проходят в настоящее время клинические испытания. Мы, однако, не претендуем на охват всех существующих систем контролируемой деградации белков, поскольку эта область активно развивается и постоянно появляются новые системы, позволяющие включать-выключать деградацию исследуемых белков.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 17-14-01107-П).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Glickman M.H., Ciechanover A. (2002) The ubiquitinproteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**, 373–428.
- Wang X., Herr R.A., Chua W.-J., Lybarger L., Wiertz E.J.H.J., Hansen T.H. (2007) Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. J. Cell Biol. 177, 613–624.
- Tokarev A.A., Munguia J., Guatelli J.C. (2011) Serinethreonine ubiquitination mediates downregulation of BST-2/tetherin and relief of restricted virion release by HIV-1 Vpu. J. Virol. 85, 51–63.
- Thrower J.S., Hoffman L., Rechsteiner M., Pickart C.M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19, 94–102.
- Kravtsova-Ivantsiv Y., Ciechanover. A. (2012) Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. J. Cell Sci. 125, 539–548.
- Boutet S. C., Disatnik M. H., Chan L. S., lori K., Lando T.A. (2007) Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. *Cell.* 130, 349–362.
- Kravtsova-Ivantsiv Y., Cohen S., Ciechanover A. (2009) Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF-kappaB precursor. *Mol. Cell.* 33, 496–504.
- Komander D. (2009) The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 937–953.

- 9. Ikeda F., Dikic I. (2008) Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* **9**, 536–542
- Бунеева О.А., Медведев А.Е. (2016) Роль атипичного убиквитинирования в клеточной регуляции. Биомед. химия. 62, 496–509.
- Meyer H.J., Rape M. (2014) Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains. *Cell.* 157, 910– 921.
- 12. Ohtake F., Tsuchiya H., Saeki Y., Tanaka K. (2018) K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **115**, E1401–E1408.
- Yau R.G., Doerner K., Castellanos E.R., Haakonsen D.L., Werner A., Wang N., Yang X.W., Martinez-Martin N., Matsumoto M.L., Dixit V.M., Rape M. (2017) Assembly and function of heterotypic ubiquitin chains in cell-cycle and protein quality control. *Cell*. **171**, 918–933.
- Pickart C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. Annu. Rev. Biochem. 70, 503–533.
- Fasanaro P., Capogrossi M.C., Martelli F. (2010) Regulation of the endothelial cell cycle by the ubiquitinproteasome system. *Cardiovasc. Res.* 85, 272–280.
- Craig K.L., Tyers M. (1999) The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72, 299–328.
- 17. Pearce M.J., Mintseris J., Ferreyra J., Gygi S.P., Darwin K.H. (2008) Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. **322**, 1104–1107.
- Sheard L.B., Tan X., Mao H., Withers J., Ben-Nissan G., Hinds T.R., Kobayashi Y., Hsu F., Sharon M., Browse J., He S.Y., Rizo J., Howe G.A., Zheng N. (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*. 468, 400–405.
- Tan X., Calderon-Villalobos L.I.A., Sharon M., Zheng C., Robinson C.V., Estelle M., Zheng N. (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*. 446, 640–645.
- 20. Kepinski S., Leyser O. (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. **435**, 446–451.
- 21. Dharmasiril N., Dharmasiril S., Estelle M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*. **435**, 441–445.
- Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He S.Y., Howe G.A., Browse J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*. 448, 661–665.
- 23. Staswick P.E. (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci.* **13**, 66–71.
- 24. Teale W.D., Paponov I.A., Palme K. (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 847–859.
- Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M. (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*. 414, 271–276.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*. 276, 1865–1868.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell.* 9, 1963–1971.
- Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T.J. (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J.* 19, 309–319.
- Nishimura K., Fukagawa T., Takisawa H., Kakimoto T., Kanemaki M. (2009) An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat. Methods.* 6, 917–923.
- Kanke M., Nishimura K., Kanemaki M., Kakimoto T., Takahashi T.S., Nakagawa T., Masukata H. (2011) Auxin-inducible protein depletion system in fission yeast. *BMC Cell Biol.* 12, 1–16.
- Kreidenweiss A., Hopkins A.V., Mordmüller B. (2013) 2A and the auxin-based degron system facilitate control of protein levels in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One*. 8, 1–6.
- Brown K.M., Long S., Sibley D.L. (2018) Conditional knockdown of proteins using auxin-inducible degron (AID) fusions in *Toxoplasma gondii*. *Bio Protoc.* 8, e2728.
- Trost M., Blattner A.C., Lehner C.F. (2016) Regulated protein depletion by the auxin-inducible degradation system in *Drosophila melanogaster*. Fly. 10, 35–46.
- Zhang L., Ward J.D., Cheng Z., Dernburg A.F. (2015) The auxin-inducible degradation (AID) system enables versatile conditional protein depletion in *C. elegans. Development.* 142, 4374–4384.
- Holland A.J., Fachinetti D., Han J.S., Cleveland D.W. (2012) Inducible, reversible system for the rapid and complete degradation of proteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, E3350–E3357.
- Morawska M., Ulrich H.D. (2013) An expanded tool kit for the auxin-inducible degron system in budding yeast. *Yeast.* 30, 341–351.
- Kubota T. (2013) The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication. *Mol. Cell.* 50, 1–8.
- Brosh R., Hrynyk I., Shen J., Waghray A., Zheng N., Lemischka I.R. (2016) A dual molecular analogue tuner for dissecting protein function in mammalian cells. *Nat. Commun.* 7, 1–13.
- Zotova A., Pichugin A., Atemasova A., Knyazhanskaya E., Lopatukhina E., Mitkin N., Holmuhamedov E., Gottikh M., Kuprash D., Filatov A., Mazurov D. (2019) Isolation of gene-edited cells via knock-in of short glycophosphatidylinositol-anchored epitope tags. *Sci. Rep.* 9, 1–10.
- Fell V.L., Schild-Poulter C. (2015) The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 763, 15–29.
- Sathyan K.M., McKenna B.D., Anderson W.D., Duarte F.M., Core L., Guertin M.J. (2019) An improved auxin-inducible degron system preserves native protein levels and enables rapid and specific protein depletion. *Genes Dev.* 33, 1441–1455.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

- 42. Barrass J.D., Mendoza-Ochoa G.I., Maudlin I.E., Sani E., Beggs J.D. (2019) Tuning degradation to achieve specific and efficient protein depletion. *J. Vis. Exp.* **149**, 1–18.
- Li S., Prasanna X., Salo V.T., Vattulainen I., Ikonen E. (2019) An efficient auxin-inducible degron system with low basal degradation in human cells. *Nat. Meth.* 16, 866–869.
- 44. Tanaka S., Miyazawa-Onami M., Iida T., Araki H. (2015) iAID: an improved auxin- inducible degron system for the construction of a 'tight' conditional mutant in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 32, 567–581.
- 45. Belli G., Gari E., Piedrafita L., Aldea M., Herrero E. (1998) An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucl. Acids Res.* **26**, 942–947.
- Natsume T., Kiyomitsu T., Saga Y., Kanemaki M.T. (2016) Rapid protein depletion in human cells by auxininducible degron tagging with short homology donor. *Cell Repts.* 15, 210–218.
- 47. Turner J.G., Ellis C., Devoto A. (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*. **14**, S153–S164.
- Shikata M., Matsuda Y., Ando K., Nishii A., Takemura M., Yokota F., Kohchi T. (2004) Characterization of *Arabidopsis* ZIM, a member of a novel plant specific GATA factor gene family. *J. Exp. Bot.* 55, 631–639.
- 49. Melotto M., Mecey C., Niu Y., Chung H.S., Katsir L., Yao J., Zeng W., Thines B., Staswick P., Browse J., Howe G.A., He S.Y. (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of *Arabidopsis* JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interaction with the COI1 F-box protein. *Plant J.* 55, 979–988.
- Feys B., Benedetti C.E., Penfold C.N., Turner J.G. (1994) *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell.* 6, 751–759.
- Sheard, L.B., Tan X., Mao H., Withers J., Ben-Nissan G., Hinds T.R., Kobayashi Y., Hsu F., Sharon M., Browse J., He S.Y., Rizo J., Howe G.A., Zheng N. (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*. 468, 400–405.
- 52. Nabet B., Roberts J.M., Buckley D.L., Paulk J., Dastjerdi S., Yang A., Leggett A.L., Erb M.A., Lawlor M.A., Souza A., Scott T.G., Vittori S., Perry J.A., Qi J., Winter G.E., Wong K., Gray N.S., Bradner J.E. (2018) The dTAG system for immediate and target-specific protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* 14, 431–441.
- 53. Bosu D.R., Kipreos E.T. (2008) Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Div.* **3**, 7.
- 54. Los G.V., Encell L.P., McDougall M.G., Hartzell D.D., Karassina N., Zimprich C., Wood M.G., Learish R., Friedman Ohana R., Urh M., Simpson D., Mendez J., Zimmerman K., Otto P., Vidugiris G., Zhu J., Darzins A., Klaubert D.H., Bulleit R.F., Wood K.V. (2008) HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* **3**, 373–382.
- 55. Neklesa T.K., Tae H.S., Schneekloth A.R., Stulberg M.J., Corson T.W., Sundberg T.B., Raina K., Holley S.A.,

Crews M.C. (2011) Small-molecule hydrophobic tagging-induced degradation of HaloTag fusion proteins. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 538–543.

- 56. Lins L., Brasseur R. (1995) The hydrophobic effect in protein folding. *FASEB J.* **9**, 535–540.
- 57. Kubota H. (2009) Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival. *J. Biochem.* **146**, 609–616.
- Tomoshige S., Naito M., Hashimoto Y., Ishikawa M. (2015) Degradation of HaloTag-fused nuclear proteins using bestatin-HaloTag ligand hybrid molecules. *Org. Biomol. Chem.* 13, 9746–9750.
- Buckley D.L., Raina K., Darricarrere N., Hines J., Gustafson J.L., Smith I.E., Miah A.H., Harling J.D., Crews C.M. (2015) HaloPROTACS: use of small molecule PROTACs to induce degradation of HaloTag fusion proteins. *ACS Chem. Biol.* 10, 1831–1837.
- 60. Tovell H., Testa A., Maniaci C., Zhou H., Prescott A.R., Macartney T., Ciulli A., Alessi D.R. (2019) Rapid and reversible knockdown of endogenously tagged endosomal proteins via an optimized HaloPROTAC degrader. *ACS Chem. Biol.* 14, 882–892.
- Pettersson M., Crews C.M. (2019) Proteolysis TArgeting chimeras (PROTACs) – past, present and future. *Drug Discov. Today Technol.* 31, 15–27.
- 62. Sakamoto K.M., Kim K.B., Kumagai A., Mercurio F., Crews C.M., Deshaies R.J. (2001) Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 8554–8559.
- Schneekloth A.R., Pucheault M., Tae H.S., Crews C.M. (2008) Targeted intracellular protein degradation induced by a small molecule: en route to chemical proteomics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 5904–5908.
- Buckley D.L., Molle I.V., Careiss P.C., Tae H.S., Michel J., Noblin D.J., Jorgensen W.L., Ciulli A., Crews C.M. (2012) Targeting the von Hippel–Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1α interaction. J. Am. Chem. Soc. 134, 4465–4468.
- 65. Itoh Y., Ishikawa M., Naito M., Hashimoto Y. (2010) Protein knockdown using methyl bestatin–ligand hybrid molecules: design and synthesis of inducers of ubiquitination-mediated degradation of cellular retinoic acid binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5820– 5826.
- 66. Gandhi A.K., Kang J., Havens C.G., Conklin T., Ning Y., Wu L., Ito T., Ando H., Waldman M.F., Thakurta A., Klippel A., Handa H., Daniel T.O., Schafer P.H., Chopra R. (2014) Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide costimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4CRBN. *Br. J. Haematol.* 164, 811–821.
- Gadd M.S., Testa A., Lucas X., Chan K-H., Chen W., Lamont D.J., Zengerle M., Ciulli A. (2017) Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* 13, 514–521.
- 68. Chessum N.E.A., Sharp S.Y., Caldwell J.J., Pasqua A.E., Wilding B., Colombano G., Collins I., Ozer B., Richards M., Rowlands M., Stubbs M., Burke R., McAndrew P.C., Clarke P.A., Workman P., Cheeseman M.D., Jones K. (2018) Demonstrating in-cell target engagement

using a pirin protein degradation probe (CCT367766). *J. Med. Chem.* **61**, 918–933.

- Nowak R.P., DeAngelo S.L., Buckley D., He Z., Donovan K.A., An J., Safaee N., Jedrychowski M.P., Ponthier C.M., Ishoey M., Zhang T., Mancias J.D., Gray N.S., Bradner J.E., Fischer E.S. (2018) Plasticity in binding confers selectivity in ligand-induced protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* 14, 706–714.
- Hines J., Gough J.D., Corson T.W., Crews C.M. (2013) Posttranslational protein knockdown coupled to receptor tyrosine kinase activation with phosphoPROTACs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110, 8942–8947.
- Khan S., He Y., Zhang X., Yuan Y., Pu S., Kong Q., Zheng G., Zhou D. (2020) PROteolysis TArgeting Chimeras (PROTACs) as emerging anticancer therapeutics. *Oncogene*. 39, 4909–4924.
- 72. Li X., Song Y. (2020) Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) for targeted protein degradation and cancer therapy. *J. Hematol. Oncol.* **13**: 50.
- Zeng S., Huang W., Zheng X., Cheng L., Zhang Z., Wang J., Shen Z. (2021) Proteolysis targeting chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: recent progress and future challenges. *Eur. J. Med. Chem.* 210, 112981.
- Kregel S., Wang C., Han X., Xiao L., Fernandez-Salas E., Bawa P., McCollum B.L., Wilder-Romans K., Apel I.J., Cao X., Speers C., Wang S., Chinnaiyan A.M. (2020) Androgen receptor degraders overcome common resistance mechanisms developed during prostate cancer treatment. *Neoplasia*. 22, 111–119.
- Chung H.K., Jacobs C.L., Huo Y., Yang J., Krumm S.A., Plemper R.K., Tsien R.Y., Lin M.Z. (2015) Tunable and reversible drug control of protein production via a self-excising degron. *Nat. Chem. Biol.* 11, 713–720.
- Brass V., Berke J.M., Montserret R., Blum H.E., Penin F., Moradpour D. (2008) Structural determinants for membrane association and dynamic organization of the hepatitis C virus NS3-4A complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 14545–14550.
- McPhee F., Sheaffer A.K., Friborg J., Hernandez D., Falk P., Zhai G., Levine S., Chaniewski S., Yu F., Barry D., Chen C., Lee M.S., Mosure K., Sun L., Sinz M., Meanwell N.A., Colonno R.J., Knipe J., Scola P. (2012) Preclinical profile and characterization of the hepatitis C virus NS3 protease inhibitor asunaprevir (BMS-650032). *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5387–5396.
- Fay E.J., Aron S.L., Stone I.A., Waring B.M., Plemper R.K., Langlois R.A. (2018) engineered small-molecule control of influenza a virus replication. *J. Virol.* 93, e01677–18.
- Rago F., DiMare M.T., Elliott G., Ruddy D.A., Sovath S., Kerr G., Bhang H.C., Jagani Z. (2019) Degron mediated BRM/SMARCA2 depletion uncovers novel combination partners for treatment of BRG1/SMARCA4-mutant cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508, 109–116.
- Zhu W., Zhang B., Li M., Mo F., Mi T., Wu Y., Teng Z., Zhou Q., Li W., Hu B. (2019) Precisely controlling endogenous protein dosage in hPSCs and derivatives to model FOXG1 syndrome. *Nat. Commun.* 10, 928.

560

- Han X., Qian X., Bernstein J.G., Zhou H., Franzesi G.T., Stern P., Bronson R.T., Graybiel A.M., Desimone R., Boyden E.S. (2009) Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the nonhuman primate brain. *Neuron.* 62, 191–198.
- Renicke C., Schuster D., Usherenko S., Essen L., Taxis C. (2013) A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function. *Chem. Biol.* 20, 619–626.
- Bonger K.M., Rakhit R., Payumo A.Y., Chen J.K., Wandless T.J. (2014) A general method for regulating protein stability with light. *ACS Chem. Biol.* 9, 111–115.
- Taxis C. (2017) Development of a synthetic switch to control protein stability in eukaryotic cells with light. *Meth. Mol. Biol.* 1596, 241–255.
- 85. Baaske J., Gonschorek P., Engesser R., Dominguez-Monedero A., Raute K., Fischbach P., Müller K., Cachat E., Schamel W.W.A., Minguet S., Davies J.D., Timmer J., Weber W., Zurbriggen M.D. (2018) Dualcontrolled optogenetic system for the rapid down-regu-

lation of protein levels in mammalian cells. *Sci. Rep.* **8**, 15024.

- Hasenjäger S., Trauth J., Hepp S., Goenrich J., Essen L., Taxis C. (2019) Optogenetic downregulation of protein levels with an ultrasensitive switch. *ACS Synth. Biol.* 8, 1026–1036.
- Harper S.M., Neil L.C., Gardner K.H. (2003). Structural basis of a phototropin light switch. *Science*. 301, 1541–1544.
- Jariel-Encontre I., Bossis G., Piechaczyk M. (2008). Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. *Biochim. Biophys. Acta.* 1786, 153–177.
- Bonger K.M., Chen L.C., Liu C.W., Wandless T.J. (2011) Small-molecule displacement of a cryptic degron causes conditional protein degradation. *Nat. Chem. Biol.* 7, 531–537.
- Nakashima Y., Ohta S., Wolf A.M. (2017) Blue lightinduced oxidative stress in live skin. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 300–310.

# MAIN APPROACHES TO CONTROLLED DEGRADATION OF PROTEINS IN THE CELL

## M. A. Kapitonova<sup>1</sup>, O. A. Shadrina<sup>1, 2</sup>, S. P. Korolev<sup>2</sup>, and M. B. Gottikh<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup> Chemical Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia <sup>2</sup> Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia \*e-mail: gottikh@belozersky.msu.ru

One of the most informative techniques in studying the role of individual proteins in the cell functioning is based on the change of their intracellular concentrations. Most often, genetic knockout or knockdown methods are used for this purpose. However, in some cases, it is more informative or convenient to act directly at the level of the expressed protein, and this action should ideally be controlled in time and reversible. This review analyzes current data on systems developed to produce such a controlled protein degradation, both by their ubiquitination and subsequent proteasome-mediated degradation, and by other processes.

Keywords: ubiquitination, proteasome-mediated degradation, auxin, degron, inducible degradation, optogenetic approach ———— ОБЗОРЫ ———

УДК 57.088

# ПРИМЕНЕНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МИКРОЧИПОВЫХ СИНТЕЗАТОРОВ ДНК, ДЛЯ СИНТЕЗА ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ

# © 2021 г. А. Н. Синяков<sup>а,</sup> \*, В. А. Рябинин<sup>а</sup>, Е. В. Костина<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,

Новосибирск, 630090 Россия \*e-mail: sinyakov@niboch.nsc.ru Поступила в редакцию 19.11.2020 г. После доработки 08.02.2021 г. Принята к публикации 13.02.2021 г.

В обзоре описано использование олигонуклеотидов, полученных с помощью синтезаторов ДНК нового поколения (микрочиповых синтезаторов ДНК), в биологических исследованиях. В настоящее время олигонуклеотиды, полученные на таких синтезаторах, используются преимущественно для конструирования больших библиотек вариантов нуклеотидных последовательностей. Эти библиотеки применяют при изучении сплайсинга, белково-нуклеиновых взаимодействий, транскрипции, трансляции и других процессов в клетках млекопитающих, бактерий и дрожжей. Сочетание методов конструирования библиотек генов из олигонуклеотидов, полученных с помощью микрочиповых синтезаторов ДНК, с развитыми способами комбинирования ДНК-дуплексов позволит получить сложные генетические конструкции, используемые в синтетической биологии.

**Ключевые слова:** олигонуклеотиды, пул, микрочипы, синтез генов, клонирование, высокопроизводительное секвенирование

DOI: 10.31857/S0026898421040108

#### введение

Эффективную, но трудоемкую технологию рекомбинантных ДНК, развитую в 70-х годах предыдущего столетия, используют в биологических и мелишинских исследованиях и в настоящее время. Эта технология, основанная на комбинировании in vitro фрагментов ДНК (небольших искусственных ДНК-дуплексов, ПЦР-фрагментов и природных генетических элементов, таких как плазмидная и геномная ДНК), позволяет осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой. Фактически технология рекомбинантных ДНК только в небольшой степени модифицирует уже существующую ДНК, как правило, бактериальные плазмиды или вирусные геномы. Технология имеет значительные ограничения, поскольку позволяет ввести только определенное число изменений в исходные генетические элементы.

Альтернативу технологии рекомбинантных ДНК при получении генетического материала *in vitro* представляет *de novo* химический синтез ДНК. При этом весь генетический материал получают из относительно простых и доступных реактивов. Химический синтез олигонуклеотидов с последующей их сборкой в требуемые ДНК-дуплексы значительно упрощает получение различных протяженных ДНК по сравнению с модификацией уже существующих природных фрагментов ДНК.

В 1970 годах с помощью химического синтеза можно было получать относительно короткие фрагменты ДНК-олигонуклеотиды длиной менее 20 нуклеотидов. В 1970–1990 годы совершенствовались методы синтеза олигонуклеотидов и их сборки в генетические конструкции, что позволило собирать искусственные гены. Следующим этапом стал синтез протяженных фрагментов ДНК (до 5000 нуклеотидов). Сейчас синтез олигонуклеотидов с последующей их сборкой в гены, а в ряде случаев в вирусные геномы, рядовое событие, поскольку автоматические синтезаторы ДНК стали коммерчески доступными.

Хотя разработано множество вариантов автоматических синтезаторов ДНК, однако прогресс в этой области не останавливается, что свидетельствует о важности этого направления. В конечном итоге именно успехи в олигонуклеотидном синтезе и привели к появлению новой инженерной науки — синтетической биологии.

Основным отличием синтетической биологии от генетической инженерии является то, что це-

левые генетические конструкции, получаемые в рамках этого метода, состоят исключительно из синтетических олигонуклеотидов. Синтетическая биология – новейшее направление науки на стыке информатики, электроники, химии и биологии, которое объединяет передовые области исследований с целью проектирования и синтеза новых живых систем, в том числе никогда не существовавших в природе. Эта наука представляет собой инженерный инструментарий для проектирования функциональных и управляемых живых систем с заданными свойствами [1, 2]. Для реализации проектов, связанных с синтетической биологией, необходим очень большой массив синтетических олигонуклеотидов.

Прогресс в синтетической биологии, по-видимому, будет связан с олигонуклеотидными микрочиповыми синтезаторами, значительно более производительными, чем традиционные колоночные или планшетные.

#### АВТОМАТИЧЕСКИЕ СИНТЕЗАТОРЫ ДНК

Работа автоматических синтезаторов ДНК основана на твердофазном олигонуклеотидном синтезе. Нерастворимый носитель с присоединенным первым звеном олигонуклеотидной цепи помещают в колонку или лунку планшета синтезатора и последовательно обрабатывают реагентами и растворителями. На первой стадии с помощью кислоты удаляют временную 4,4'-диметокситритильную защитную группу с первого звена, на следующей – присоединяют второй нуклеотид, затем блокируют непрореагировавшие гидроксильные группы и окисляют трехвалентный фосфор в пятивалентный. Цикл наращивания цепи повторяют до тех пор, пока целевой олигонуклеотид не будет синтезирован. Такая схема синтеза реализована во множестве различных синтезаторов ДНК (традиционные синтезаторы ДНК). В традиционных синтезаторах ДНК необходимо подводить реагенты по выделенным каналам к колонкам или лункам планшета, в которых на поверхности твердого носителя происходит синтез индивидуальных олигонуклеотидов. В таких синтезаторах каждый олигонуклеотид синтезируется и выделяется индивидуально. Чем больше олигонуклеотидов синтезируется одновременно, тем сложнее схема коммуникаций синтезатора. Поэтому, как правило, в работе используются 8-16-колоночные синтезаторы или 96-384-луночные планшетные синтезаторы ДНК. Для задач синтетической биологии такая производительность мала. Так, полный геном человека 96-луночный планшетный ДНК-синтезатор сможет синтезировать, работая каждый день в три смены, только за ~1100 лет.

В начале 90-х годов прошлого века фирма "Affymetrix" разработала твердофазный метод синтеза олигонуклеотидов с использованием фотолабильных соединений (рис. 1), что в конечном итоге привело к созданию индустрии ДНК-микрочипов [3, 4].

На поверхность слайда ковалентно присоединяют спейсер, несущий фотолабильную группу. Через физическую маску (фотошаблон, изготовленный из пластины с прорезями для засвечивания слайда УФ-излучением) происходит засветка участков поверхности – спотов, на которых синтезируются олигонуклеотиды одной структуры. В этих местах происходит удаление фотолабильной защитной группы. Затем всю поверхность слайда обрабатывают соответствующим амидофосфитом, несущим фотолабильную группу. Присоединение амидофосфита происходит только в местах деблокирования фотолабильной группы. На следующих стадиях происходит облучение других спотов и присоединение в этих местах другого амидофосфита (рис. 1). Циклы наращивания цепи повторяются до тех пор, пока не будет завершен синтез последнего олигонуклеотида. Фактически при синтезе олигонуклеотидов используется традиционный амидофосфитный метод [5] с заменой кислотолабильной 4,4'-диметокситритильной группы на фотолабильную защитную.

Вначале в "Affymetrix" использовали фотолитографию с физическими масками для деблокирования временных фотолабильных защитных групп. В настоящее время физические фотомаски в приборах заменены на виртуальные, значительно упрощающие процесс синтеза [6, 7]. Фотошаблоны в этом случае создаются с помощью платы управляемых микрозеркал.

На одном слайде "Affymetrix" можно синтезировать до 1.3 млн спотов, содержащих 25-членные олигонуклеотиды [8]. Громадное увеличение производительности синтеза произошло из-за отказа от индивидуального синтеза олигонуклеотидов и, как следствие, от множества коммуникаций. Фактически в чипе есть только вход и выход, по которым подаются и выводятся реактивы. Управление синтезом олигонуклеотидов происходит с помощью УФ-излучения.

К настоящему времени появились и другие фирмы, сконструировавшие микрочиповые синтезаторы ДНК.

Микрочиповый реактор фирмы "Febit Gmbh" состоял из восьми независимых фрагментов, на каждом из которых можно было проводить одновременный синтез до 15000 разных олигонуклеотидов (всего 120000 олигонуклеотидов). Способ проведения олигонуклеотидного синтеза был аналогичен способу фирмы "Affymetrix" за одним исключением, олигонуклеотидный синтез проводили в капиллярах, а не на поверхности плоского слайда [9]. В течение суток на одном реакторе можно было получить до 480000 олигонуклеоти-

#### СИНЯКОВ и др.



Рис. 1. Схема олигонуклеотидного синтеза на микрочипе с использованием фотолабильных защитных групп.

дов. В настоящее время "Febit Gmbh" отсутствует на рынке.

Указанные фирмы используют в своих синтезаторах дорогие амидофосфиты, содержащие фотолабильную группу.

С целью снижения операционных расходов созданы микрочиповые синтезаторы, использующие стандартные амидофосфиты с 4,4'-диметокситритильной группой. В этих синтезаторах деблокирование осуществляется с помощью кислоты, получаемой путем электролиза либо генерируемой из фотокислот УФ-облучением. В обоих типах таких синтезаторов поверхность слайда пришлось разбивать на ячейки для синтеза индивидуальных олигонуклеотидов. Они необходимы для удержания кислоты от диффузии на участки слайда, где не должно проходить деблокирование. Из-за необходимости создания ячеек на слайде число одновременно синтезируемых олигонуклеотидов в этих синтезаторах значительно меньше, чем в синтезаторах, использующих фотолабильные амидиты.

Биочиповый реактор microfluidic µParaflo, разработанный сотрудниками фирмы "LC Sciences" [7], использует стандартные реагенты для олигонуклеотидного синтеза и позволяет одновременно синтезировать 4000—8000 разных олигонуклеотидов. Синтез осуществляется в индивидуальных ячейках, отделенных друг от друга. Деблокирование кислотолабильной 4,4'-диметокситритильной группы происходит при разложении фотокислоты под действием УФ-излучения. Фотокислота закачивается одновременно во все ячейки, но освещается только та их часть, в которой должно проходить наращивание олигонуклеотидной цепи. Для проведения синтеза используются фотокислоты, строение которых неизвестно.

"CombiMatrix Corporation" разработан микрочиповый синтезатор, в котором используется поле управляемых электродов [10]. Поверхность чипа разбита на ячейки, в которых осуществляется синтез и находится пара электродов. Для олигонуклеотидного синтеза используется стандартная схема и реагенты амидофосфитного олигонуклеотидного синтеза. Кислота, необходимая для деблокирования временной диметокситритильной группы, генерируется в микроячейке с помощью электролиза. Кассеты для синтеза содержат 8, 12 или 90 тысяч ячеек.

Синтезатор фирмы "Agilent Technologies" способен синтезировать до 1 млн олигонуклеотидов на одном слайде [11, 12]. Синтезатор использует стандартные амидофосфиты и традиционную схему олигонуклеотидного синтеза с временной кислотолабильной 4,4'-диметокситритильной защитной группой. Основное отличие этого синтезатора состоит в использовании для доставки ре-
агентов в споты микрочипа устройства, применяемого в струйных принтерах. Длина синтезируемых олигонуклеотидов достигает 200 нуклеотидных звеньев.

Олигонуклеотиды, полученные с помощью микрочиповых синтезаторов, на несколько порядков дешевле, чем олигонуклеотиды, полученные на традиционных синтезаторах (цена за нуклеотид варьирует в зависимости от длины, масштаба и используемого синтезатора). Микрочиповые синтезаторы позволяют получать олигонуклеотиды в очень широких пределах: от десятков до миллионов олигонуклеотидов с одного микрочипа.

Чрезвычайно широкий ассортимент олигонуклеотидов, получаемых на микрочиповых синтезаторах ДНК, наряду с дешевизной, побудили применить их в генно-инженерных работах.

Ниже рассмотрены примеры применения таких олигонуклеотидов для создания библиотек генетических элементов и методы, позволяющие использовать их смеси для конструирования генов и более протяженных фрагментов геномной ДНК.

### КОНСТРУИРОВАНИЕ БИБЛИОТЕК ИЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МИКРОЧИПОВЫХ СИНТЕЗАТОРОВ ДНК

В настоящее время одним из основных направлений использования олигонуклеотидов, полученных на микрочиповых синтезаторах, является конструирование больших библиотек регуляторных элементов для оптимизации экспрессии генов. Изучению структурных и функциональных характеристик тысяч *цис*-регуляторных элементов, отвечающих за транскрипционные, трансляционные и другие процессы в клетках млекопитающих, бактерий и дрожжей, посвящено большое количество работ.

С помощью пула олигонуклеотидов, синтезированных на микрочиповом синтезаторе, получена библиотека векторов, экспрессирующих короткие РНК, образующие шпильки (shPHK), предшественники малых интерферирующих РНК (siPHK) [13]. Всего проанализировано 32000 генов мыши и человека и выбрано 382982 последовательности, гомологичных исследуемым генам.

Синтезированные на микрочипе олигонуклеотиды отделяли от слайда, деблокировали и амплифицировали. Полученные ампликоны клонировали в целевом векторе. С помощью этого подхода получена библиотека, продуцирующая 53478 различных shPHK. Выход целевых векторов, экспрессирующих shPHK, составил ~14%, что связано, по-видимому, с отсутствием стадии очистки олигонуклеотидов от мутированных последова-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

тельностей. Во многих работах по генетическому конструированию эта стадия стала обязательной.

Сконструирована библиотека векторов, экспрессирующих shPHK к 14500 генам человека и 12700 генам мыши [14].

Для проектирования искусственных генных сетей очень важно иметь хорошо охарактеризованные регуляторные элементы, функционирующие в различных микроорганизмах.

Получена библиотека, содержащая 29249 регуляторных элементов (промотор, сайт связывания рибосомы, сайт старта транскрипции) длиной в среднем 165 п.н., относящихся к 184 прокариотическим геномам. Эту библиотеку использовали для изучения уровня транскрипции и трансляции генов в различных бактериях [15].

Подобную работу провели Church и сотрудники [16], которые получили библиотеку из 114 промоторов и 111 сайтов связывания рибосомы *Escherichia coli*, содержащую 12563 элемента, и использовали ее для оценки уровней транскрипции и экспрессии генов.

С целью изучения структурно-функциональной организации бактериальных промоторов фагов Т3, Т7 и SP6 из олигонуклеотидов длиной 200 п.н. синтезировали 12972 варианта этих промоторов [17].

При изучении влияния структуры сайтов связывания факторов транскрипции на силу синтетических промоторов использовали набор из 52429 олигонуклеотидов длиной 100 нуклеотидных звеньев [18].

В лаборатории Kosuri [19] создана библиотека, содержавшая 10898 промоторов  $\sigma$ 70, которую использовали для изучения влияния структуры -10, -35, UP и спейсерных элементов на эффективность экспрессии генов.

Для изучения структурно-функциональных свойств промоторов из набора 150-членных олигонуклеотидов была сконструирована библиотека, включающая 6500 различных промоторов [20].

Библиотеку из ~27000 элементов, полученную из пула 142-членных олигонуклеотидов, использовали для изучения транскрипционных регуляторных элементов в клетках человека [21]. Библиотека была получена как комбинация вариантов двух энхансеров. В развитие предложенного метода изучения энхансеров генов человека из олигонуклеотидов, полученных с помощью микрочипового синтезатора, сконструирована библиотека, содержащая 54000 элементов потенциальных энхансеров [22].

С помощью 150-членных олигонуклеотидов в работе [23] получено 1040 энхансеров гена родопсина мыши. Для создания библиотеки из 1300 энхансеров использовали 150-членные олигонуклеотиды [24]. Библиотека из ~5000 последовательностей, содержащих различные сайты связывания 12 транскрипционных факторов, получена с помощью 200-членных олигонуклеотидов [25].

Из олигонуклеотидов, полученных с помощью микрочипового синтезатора ДНК, синтезировали библиотеку для транскрипции 127 рибопереключателей [26].

С помощью синтетических библиотек, полученных из микрочиповых олигонуклеотидов, можно упростить и интенсифицировать проведение работ в области эпигенетики, сплайсинга, мутагенеза, оптимизации гетерологичной экспрессии генов и изучения белково-нуклеиновых взаимодействий.

Библиотеку из 27733 вариантов 2198 экзонов использовали для изучения механизма сплайсинга [27].

В экспериментах по определению специфичности нуклеиново-белковых взаимодействий в нуклеосомах использовали 40000 ДНК-дуплексов, полученных из 150-членных олигонуклеотидов [28].

Использование библиотеки, содержащей ~10000 181-членных олигонуклеотидов, полученных путем микрочипового олигонуклеотидного синтеза, позволило ввести с помощью технологии CRISPR/Cas9 множественные мутации в состав 1034 генов Saccharomyces cerevisiae с целью выявления генов, влияющих на жизнеспособность этого микроорганизма [29].

С помощью олигонуклеотидов, полученных на микрочиповых синтезаторах, создана библиотека клонов (более 18000), экспрессирующих гидовые РНК (gPHK) системы CRISPR/Cas9, для 1117 генов дрожжей [30].

Библиотеку из 13000 130-членных олигонуклеотидов использовали для проведения множественного мутагенеза в бактериальных геномах [31].

С помощью олигонуклеотидов, полученных на микрочиповых синтезаторах ДНК, создана библиотека, содержащая 7800 из 7828 возможных мутантных форм гена β2-адренергического рецептора (ADRB2) [32].

Сконструирована библиотека фрагментов ДНК, содержащая 14234 различные комбинации промоторов, сайты связывания рибосомы и 11 N-концевых кодонов 5'-области гена [33]. Использование редких N-концевых кодонов позволило значительно повысить уровень его экспрессии (до 14 раз). Предложенный подход позволяет оптимизировать экспрессию генов в штаммах-продуцентах [34].

С помощью олигонуклеотидов, синтезированных на микрочиповых синтезаторах ДНК, получена библиотека [35] из 17406 *цис*-регуляторных элементов, изучено влияние их структуры на уровень экспрессии генов.

### ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ ИЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ТРАДИЦИОННЫХ КОЛОНОЧНЫХ ИЛИ ПЛАНШЕТНЫХ СИНТЕЗАТОРАХ

Как отмечено выше, олигонуклеотиды, полученные на традиционных синтезаторах, выделяют индивидуально. Каждый из них можно очистить с помощью ВЭЖХ или гель-электрофореза. Количество каждого олигонуклеотида, получаемого при синтезе, на несколько порядков превосходит потребности генетического конструирования. При этом всегда существует возможность замены части олигонуклеотидов, если встретятся проблемы при их сборке в целевую конструкцию, путем дополнительного синтеза.

Однако число олигонуклеотидов в наборах для конструирования генов, полученных с помощью традиционных синтезаторов, ограничено и варьирует от 5 до 50, а длина синтезируемых ДНК-фрагментов колеблется от 200 до 3000 п.н.

Первые искусственные гены были получены группой Gobind Khorana [36, 37] из коротких фосфорилированных по 5'-концу олигонуклеотидов (6–8 нуклеотидов).

Олигонуклеотиды отжигали в реакционной смеси, формировали дуплекс, в котором происходила сшивка смысловой и антисмысловой цепей (рис. 2*a*). Процедуру сшивки верхних и нижних цепей повторяли с другими дуплексами до полного завершения синтеза целевого гена.

С появлением термостабильных ДНК-лигаз и ДНК-полимераз, развитием олигонуклеотидного синтеза, позволяющего получать протяженные олигонуклеотиды (~40 п.н.), формирующие более стабильные ДНК-дуплексы, стало возможным собирать гены в один прием [38, 39]. С этой целью применяют, в частности, полимеразную циклическую сборку (PCA, Polymerase cycling assembly) (рис. 26), которая используется для удлинения перекрывающихся олигонуклеотидов в двухцепочечный фрагмент при термоциклировании [40]. На финальной стадии в методах, использующих лигирование и РСА, для получения полноразмерных продуктов из частично собранных конструкций применяют ПЦР. Недавно Gibson с сотрудниками разработали как in vivo [41, 42], так и in vitro [43, 44] одностадийный протокол для сборки и клонирования ДНК-дуплексов непосредственно в плазмиду. Все эти протоколы, лежащие в основе различных вариантов синтеза генов, многократно улучшались (обзоры [45-48]). Поскольку синтез и сборка не происходят безошибочно, гены клонируют и подтверждают их структуру секвенированием.



Рис. 2. Получение фрагментов ДНК методом Khorana (а) и с помощью полимеразной циклической сборки (б).

У каждого подхода есть свои достоинства и недостатки. Методы, основанные на лигировании дуплексов, приводят к пониженному числу ошибок. поскольку неправильные дуплексы "сшиваются" с меньшей эффективностью. Но в этом случае больше времени требуется для синтеза олигонуклеотидов (необходимо синтезировать как смысловую, так и антисмысловую цепи, фосфорилировать 5'-концы олигонуклеотидов, в результате чего повысится стоимость исходных олигонуклеотидов). В подходах, основанных на использовании РСА, используют частичное перекрывание олигонуклеотидов (15-25 п.н.), что снижает необходимый объем синтеза, однако метод страдает от повышенного числа ошибок, связанного с отсутствием отбора неправильных дуплексов на части целевой последовательности. В процессе РСА-конструирования формируются одноцепочечные районы, поэтому такие районы можно использовать для получения измененных форм целевой последовательности. Поскольку на финальной стадии используется амплификация частично комплементарных фрагментов, длина генетических структур, полученных этими методами, обычно не превышает 5000 п.н.

Следует отметить, что получение генетических структур запланированной последовательности сильно зависит от чистоты исходных олигонуклеотидов. По статистике при конструировании генов из 50-членных очищенных олигонуклеотидов, полученных с выходом 99.9% на стадию, только одна из 10 последовательностей длиной 1000 п.н. имеет правильную структуру, остальные содержат различные "мутации". Число ошибок растет экспоненциально с ростом длины конструируемой последовательности, поэтому одновременная сборка большого количества олигонуклеотидов непрактична. Гетерогенность продуктов сборки олигонуклеотидов приводит к необходимости клонирования, выделения и секвенирования ДНК отдельных клонов при поиске структуры, не содержащей ошибок [49]. Это значительно удорожает и удлиняет процедуру генетического конструирования. *А priori* дополнительная очистка исходных олигонуклеотидов должна упростить и удешевить процесс генетического конструирования. Ниже приведены примеры конструирования протяженных ДНК из олигонуклеотидов традиционных синтезаторов.

Синтез генетических конструкций начался с работ Gobind Khorana [36, 37] по конструированию искусственных генов аланиновой тРНК (72 п.н.) и супрессорной тирозиновой тРНК (126 п.н.). Олигонуклеотиды синтезировали без применения автоматических синтезаторов. Работа по получению каждого из генов заняла ~ 8 лет.

С появлением автоматических синтезаторов работы по конструированию генов значительно интенсифицировались, и исследователи смогли перейти к синтезу *in vitro* полных геномов микроорганизмов. Первым получили геном полиовируса в виде его кДНК-копии (7500 п.н.) [50]. Работа по конструированию заняла 3 года. Ventor и сотрудники синтезировали геном бактериофага  $\varphi$ X174 (5386 п.н.) [51], а Evans и сотрудники – геном вируса оспы лошадей (212633 п.н.) [52].

К настоящему времени синтезировано несколько бактериальных геномов. Группа Ventor потратила ~15 лет и 40 млн долларов на создание первых искусственных геномов бактерий *Мусоplasma genitalium* (582970 п.н.) и *М. mycoides* (1080000 п.н.) [53, 54].

Консорциум, состоящий из 21 института, осуществил *in vitro* синтез генома пресноводной бактерии *Caulobacter ethensis-2.0* (785701 п.н) [55].

Как видно из приведенных выше примеров, конструирование протяженных геномов занимает много времени. Поэтому получение геномов, более сложных, чем бактериальные, например генома человека, требует среди прочего более производительных ДНК-синтезаторов. Микрочиповые синтезаторы представляются вполне пригодными для этой цели. Однако для их успешного применения необходима модификация методов очистки олигонуклеотидов, полученных на этих синтезаторах, и методов их сборки в целевые последовательности ДНК.

### СИНТЕЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СТРУКТУР ИЗ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО СЕКВЕНИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Микрочиповые синтезаторы способны очень быстро синтезировать десятки тысяч и даже миллионы олигонуклеотидов заданной структуры. В отличие от традиционных синтезаторов все олигонуклеотиды, полученные с помощью микрочиповых синтезаторов, находятся в одной реакционной смеси (олигонуклеотидном пуле). Кроме того, концентрация олигонуклеотидов пула, как правило, недостаточна для проведения генно-инженерных работ, а их качество ниже из-за большего процента ошибок в структуре ДНК. Как отмечено выше, успех генетического конструирования очень сильно зависит от чистоты олигонуклеотидов. Очистить олигонуклеотиды, полученные на микрочипе, традиционными методами невозможно.

Методы высокопроизводительного секвенирования (NGS) позволяют отбирать из олигонуклеотидного пула последовательности, не содержащие ошибок в своей структуре. В процессе NGS-секвенирования происходит увеличение количества целевых олигонуклеотидов вследствие их амплификации. Таким образом, применение процедуры NGS-секвенирования позволяет получить олигонуклеотиды правильной структуры, пригодные для конструирования протяженных ДНК, в количествах, необходимых для проведения генно-инженерных работ.

Секвенатор GS FLX Roche 454 использовали для NGS-секвенирования олигонуклеотидов, полученных на микрочиповых или традиционных синтезаторах [56–58]. Микрошарики, содержащие на свой поверхности олигонуклеотиды целевой структуры, доставали из платы секвенатора с помощью роботизированного микроманипулятора. Олигонуклеотиды отщепляли от поверхности микрошариков, амплифицировали, с помощью эндонуклеаз рестрикции LguI/SapI удаляли адапторы для секвенирования и использовали для генетического конструирования. Предполагается, что такой подход позволяет снизить уровень ошибок в целевых конструкциях в 500 раз.

Метод, в котором применяли специально сконструированную систему с использованием пульсирующего лазера для отбора микрошариков с олигонуклеотидами правильной структуры с секвенатора NGS GS Junior, получил название "снайперское клонирование". Этот метод позволяет получить за неделю 5188 олигонуклеотидов целевой структуры из одного олигонуклеотидного пула. [59, 60]

В рассмотренных методах применяют механические способы отбора клонов целевых олигонуклеотидов. В качестве альтернативы создан метод отбора совершенных олигонуклеотидов с помощью баркодированных праймеров.

Для фракционирования олигонуклеотидного пула используют клонирование в дрожжевом векторе с последующим баркодированием и NGSсеквенированием на секвенаторе Illumina [61].

Разработан метод "дробовика", использующего баркодированные олигонуклеотиды [62, 63] (рис. 3).

В работе использовали 228 олигонуклеотидов длиной 150 нуклеотидов, которые содержали две фланкирующие последовательности (2 × 25 нуклеотидов), включающие EarI- или BtsI-сайты и конструкционную часть (100 нуклеотидов). Олигонуклеотиды были синтезированы на микрочипе, отщеплены от поверхности и амплифицированы (рис. 3*a*). Реакционную смесь обрабатывали рестриктазами Earl и Btsl, частично отщепляя праймеры для амплификации. На следующей стадии осуществляли попарную сборку фрагментов, получая конструкции с 200 п.н., и амплификацию продуктов с помощью оставшихся праймеров (см. рис. 3б). Затем к ДНК-дуплексам присоединяли баркодированные праймеры, используемые для секвенирования и амплификации (рис. 3в). Не содержащие ошибок фрагменты после амплификации с баркодированными праймерами и выделения конструкционной части успешно использовали для получения 11 т.п.н. последовательности кластера генов биосинтетического пенициллина. Уровень ошибок при получении фрагментов кластера составлял 1/4600 п.н.

Подобный метод, за исключением промежуточной сборки 200-членных нуклеотидных дуплексов, использовали для конструирования 15 генов *E. coli* K12 [64].

### СИНТЕЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СТРУКТУР ИЗ ПУЛОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА МИКРОЧИПОВЫХ СИНТЕЗАТОРАХ ДНК

При применении олигонуклеотидного пула для генетического конструирования необходимо преодолеть ряд затруднений, связанных с тем что:

1. уровень ошибок в олигонуклеотидах, полученных на микрочипе, выше, чем у олигонуклеотидов, синтезируемых традиционным методом;

2. сборка фрагментов генов становится затруднительной в смесях, содержащих значительное количество "посторонних" олигонуклеотидов;



**Рис. 3.** Общая схема синтеза ДНК с помощью метода "дробовика". Синтез олигонуклеотидов на микрочипе (*a*), частичное расщепление рестриктазой типа IIS (*б*), присоединение баркодов и селективная ПЦР (*c*), сборка кластеров генов (*d*).

3. возможность кросс-гибридизации накладывает строгие ограничения на структуру синтезируемых на микрочипе олигонуклеотидов;

4. мольные количества олигонуклеотидов, находящихся в пуле, недостаточны для проведения ферментативных реакций. Синтез на микрочипе идет на очень малой поверхности  $(1-1.5 \text{ см}^2)$ , поэтому обычно весь пул олигонуклеотидов, полученный с одного микрочипа, содержит 1-20 пмоль смеси олигонуклеотидов. Это означает, что содержание каждого отдельного олигонуклеотида колеблется в пределах от нескольких амоль до нескольких фмоль, что недостаточно для проведения ферментативных реакций в стандартных условиях (1 пмоль).

"Combimatrix Corporation", по-видимому, первой попыталась использовать олигонуклеотиды, полученные с помощью микрочиповых синтезаторов для сборки генов [65].

Первыми трудности, связанные с использованием олигонуклеотидных пулов при генетическом конструировании протяженных последовательностей ДНК, были успешно преодолены Тian и сотрудниками [66–68]. Для повышения концентрации целевых олигонуклеотидов они предложили амплифицировать синтезированные олигонуклеотиды с 10<sup>5</sup> (или 10<sup>9</sup> в случае микрочипов низкой плотности) молекул до 10<sup>9</sup> (или 10<sup>12</sup> в случае микрочипов низкой плотности), что позволяет провести стадии отбора олигонуклеотидов правильной структуры и их сборки в целевую последовательность.

Общая схема генетического конструирования приведена на рис. 4. Олигонуклеотиды синтезировали с использованием микрочипового синтезатора Atactic/Xeotron 4K, содержащего 3968 реакционных ячеек. Выход целевого олигонуклеотида с каждой ячейки не превышал 5 фмоль. Каждый олигонуклеотид содержал последовательности сайтов для амплификации и сайты эндонуклеаз рестрикции типа IIS для удаления амплификационных праймеров. Схожая стратегия конструирования структур олигонуклеотидов, содержащих сайты MluI-рестриктазы, использована в [69, 70]. В результате амплификации количество каждого олигонуклеотида увеличивалось в миллион раз.

Как уже сказано, в структуре синтезируемых олигонуклеотидов в процессе их получения неизбежно возникают ошибки, поэтому очень важно провести предварительное выделение олигонуклеотидов правильной структуры. Это значительно упростит поиск целевых генетических структур после сборки олигонуклеотидов. Для очистки олигонуклеотидов использовали гибридизацию с короткими олигонуклеотидами [66–68]. Олигонуклеотиды после амплификации обрабатывали рестриктазами IIS-типа, отщепляющими праймерные участки, полученные смеси последовательно гибридизовали с двумя олигонуклеотидными зондами. Целевой олигонуклеотид, необ-



**Рис. 4.** Схема конструирования гена, предложенная Tian J. с сотрудниками.

ходимый для генетического конструирования, очищали на двух олигонуклеотидах, комплементарных каждой его половине.

Олигонуклеотиды, предназначенные для гибридизации, также синтезировали на микрочипе, амплифицировали и иммобилизовывали на магнитные частицы. При сборке генов использовали одностадийную полимеразную сборку. Оценивали эффективность проведенной очистки олигонуклеотидов.

Как видно из табл. 1, очистка олигонуклеотидов путем гибридизации перед "сшивкой" снижает уровень ошибок в целевой конструкции в 8.7 раза по сравнению с неочищенными олигонуклеотидами. Всего из олигонуклеотидного пула [66—68] получен 21 ген, кодирующий варианты малой рибосомной субъединицы *E. coli*. В работе проведен компьютерный расчет структуры целевых генов с целью элиминирования неправильного спаривания олигонуклеотидов.

Аналогичный подход к синтезу генов из олигонуклеотидных пулов использован в работах [71, 72]. Как правило, одномоментно собирали фрагменты ДНК протяженностью 300—700 п.н. (в редких случаях 1—2 т.п.н.). Для упрощения синтеза протяженных генов предложено разбивать такие

Метод очистки	Всего, п.н.	Замены	Трансверсии	Делеции	Вставки	П.н./одна ошибка
Гибридизация	23641	7	3	5	2	1394
ΠΑΑΓ	24546	28	12	11	3	455
Без очистки (РАМ)	9243	25	13	19	1	159
Без очистки (лигирование)	6093	6	6	22	4	160

Таблица 1. Уровень ошибок при конструировании генов из олигонуклеотидных пулов

последовательности на фрагменты длиной не более 500 п.н. [73]. Таким способом были успешно синтезированы гены ДНК-полимераз Dpo4 (1056 п.н.) и Pfu (2325 п.н.).

Очистка олигонуклеотидов пула с помощью гибридизации существенным образом сказалась на снижении уровня ошибок в структуре целевого гена. При этом гибридизационная селекция олигонуклеотидов, не содержащих ошибок в последовательности, требовала проведения отдельной стадии.

Боровков и соавт. [74] интегрировали процесс отбора олигонуклеотидов правильной структуры в саму стадию сборки целевой последовательности. Они применяли лигазную сборку с использованием термостабильной Таq-ДНК-лигазы (LCR, ligase chain reaction, лигазная цепная реакция). Это позволило упростить и удешевить процесс конструирования генетического материала, поскольку в этом случае использовали неочищенные пулы олигонуклеотидов. Лигирование при повышенной температуре позволяет "отсеять" олигонуклеотиды с ошибками в структуре, которые не образуют стабильных дуплексов при этой температуре, и тем самым значительно снизить число ошибок в целевой конструкции.

Метод включал следующие стадии.

1. Все гены набора объединяли в виртуальную последовательность, которую разбивали на нормализованные по температуре олигонуклеотиды ( $55 \pm 1^{\circ}$ C). Олигонуклеотиды выбирали с помощью специальной компьютерной программы, упрощающей процесс сборки путем разрушения А-Т- и G-C-богатых районов последовательности, прямых и обратных повторов, микросателлитов и других нежелательных ДНК-фрагментов.

 Синтезировали олигонуклеотиды с фосфатной группой на 5'-конце и выделяли в виде олигонуклеотидного пула.

3. Олигонуклеотидный пул превращали в смесь частично перекрывающихся блоков унифицированного размера. Каждый блок состоял из фрагмента гена и фланкирующих участков (UPR), содержащих сайт для расщепления рестриктазой MlyI. Блоки собирали лигированием в тщательно контролируемых условиях, предотврашающих внедрение в их состав олигонуклеотидов с ошибками. Присутствие в лигазной смеси РЕG6000 значительно ускоряло процесс сборки в условиях очень низкой концентрации олигонуклеотидов. Собранные блоки амплифицировали (10 циклов РСА), чтобы получить достаточное количество материала для ПЦР всех запланированных индивидуальных генов.

4. После удаления фланкированных районов частично перекрывающиеся блоки собирали в целевые гены с помощью ПЦР, каждый ген со своей парой специфических праймеров.

Экспериментально установлено, что эффективную сборку генов можно проводить при общем количестве олигонуклеотидов в пуле не более 4000 и размере блока 270 п.н. Уровень ошибок составлял 2.7 на 1 т.п.н.

Использование LCR снижало уровень ошибок в целевых конструкциях в 4 раза (с 6.3/1 до 1.6/1 т.п.н.) [71]. Таким образом, по уровню ошибок неочищенные олигонуклеотиды, полученные с помощью микрочиповых синтезаторов, в LCR сравнимы с олигонуклеотидами, синтезированными на традиционных синтезаторах, в PCA.

С помощью метода, предложенного Боровковым и соавт. [74], в котором используется термостабильная лигаза, получены 85 вариантов гена *GFP*, длиной 800 п.н. каждый [75], и библиотека для транскрипции 127 рибопереключателей (суммарная длина синтезированной последовательности — 40 т.п.н.) [26].

### СИНТЕЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СТРУКТУР ИЗ ПОДПУЛОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА МИКРОЧИПОВЫХ СИНТЕЗАТОРАХ ДНК

В упомянутых выше методах протяженные фрагменты ДНК конструировали с использованием от нескольких десятков до нескольких тысяч олигонуклеотидов. Получение отдельных генов с использованием пулов, содержащих большое количество олигонуклеотидов (больше 1000), становится трудной задачей в основном из-за кросс-гибридизации [76].

Решить эту проблему можно с помощью двух подходов, основанных на выделении подпулов, необходимых для получения только одной генетической конструкции.

В первом подходе использовали баркоды, позволяющие проводить ПЦР олигонуклеотидов, относящихся только к одной сборке, с последующим отщеплением этих баркодов и сборкой целевой конструкции стандартными методами [77–79]. Эту схему тестировали с использованием двух олигонуклеотидных пулов, содержащих около 13000 130- или 200-членных олигонуклеотидов, соответственно. На рис. 5. приведена схема использования этих пулов для олигонуклеотидного синтеза.

Для облегчения разделения исходного олигонуклеотидного пула на подпулы выбрали наборы 20-членных праймеров с малой способностью к кросс-гибридизации ("ортогональные праймеры"). Эти праймеры были созданы на основе набора из 244000 25-членных ортогональных последовательностей, разработанных для баркодирования [80]. Из-за разных требований к дальнейшему использованию исходных олигонуклеотидных пулов были сконструированы два отдельных набора ортогональных праймеров к ним.



**Рис. 5.** Схема синтеза генов с использованием олигонуклеотидного пула. Предварительно рассчитанные олигонуклеотиды синтезированы на микрочипе, затем отщеплены от поверхности с образованием олигонуклеотидного пула. В структуру заложены последовательности праймеров, позволяющие амплифицировать подпулы. Последовательности праймеров затем отщепляли и проводили сборку целевых генов.

Олигонуклеотиды пулов 1 и 2 были спроектированы для тестирования эффекта длины перекрывания при синтезе. Гены, получаемые с помощью олигонуклеотидов пула 1, образовывали совершенные дуплексы. Олигонуклеотиды пула 2 формировали ДНК-фрагменты с частичным перекрыванием (около 20 п.н.) и превращались в полные дуплексы после проведения ПЦР.

Сконструирован набор генов флуоресцентных белков (GFP), предназначенных для проверки эффективности метода синтеза генов с помощью обоих олигонуклеотидных пулов. Гены выделяли и клонировали в экспрессионном векторе. При этом уровень ошибок в 130-членных олигонуклеотидах был достаточно низким, поскольку более 50% клонов содержали правильную структуру клонированного фрагмента. В этом случае уровень ошибок в генах, полученных из олигонуклеотидов, синтезированных на микрочиповых синтезаторах, был таким же, как в генах, получаемых с помощью олигонуклеотидов, синтезированных на традиционных синтезаторах.

При конструировании генов из пула, содержащего 200-членные олигонуклеотиды, получено только 6% правильных структур, уровень ошибок составил 1/250 п.н., что значительно выше, чем в случае 130-членных олигонуклеотидов (1/1000). Это не удивительно, поскольку уровень апуринизации синтезируемого олигонуклеотида зависит от числа деблокирований, т.е. от его длины.

Для снижения уровня ошибок в генах, синтезируемых с использованием обоих олигонуклеотидных пулов, применяли набор ErrASE — коммерческую смесь ферментов, обнаруживающих и гидролизующих дуплексы, содержащие неспаренные пары оснований. При этом уровень ошибок в генах, полученных из 200-членных олигонуклеотидов, удалось понизить в 4–8 раз – до 1/(1000–2000) п.н. В генах, полученных из 130-членных олигонуклеотидов, уровень ошибок составил 1/(5000–7000) п.н.

С целью проверки разработанной технологии с использованием 200-членных олигонуклеотидов осуществлен синтез 42 генов, кодирующих вариабельные районы фрагментов одноцепочечных антител (scFv). Средний уровень ошибок в секвенированных генах составил 1/315 п.н., что также значительно выше, чем при сборке *GFP* из 130-членных олигонуклеотидов, но оставался приемлемым для конструирования генов этого размера (правильную структуру должны иметь в среднем 10% клонов).

Исходя из схемы, предложенной в [77], разработан высокопроизводительный метод синтеза ДНК, включающий одновременную амплификацию всех подпулов, исправление ошибок и сборку фрагментов [81]. Расчет структуры использованных олигонуклеотидов проводили с помощью программы DNAworks. 36 Подпулов (479 олигонуклеотидов) амплифицировали в одной реакции с ортогональными праймерами. Использовали очень эффективный высокопроизводительный метод коррекции ошибок после полной амплификациии олигонуклеотидного пула. На этой стадии несовершенные дуплексы удаляли путем аффинной хроматографии на колонках, содержаших белки системы репарации *E. coli*. Все олигонуклеотиды пула были успешно амплифицированы и очищены. Олигонуклеотидный пул, обогащенный структурами, не содержащими ошибок, выделяли и одновременно амплифицировали в 36 целевых фрагментов ДНК, используя LCR. При этом из 36 целевых последовательностей получены 24 структуры.



**Рис. 6.** Схема синтеза генов на микрочипе с физически разделенными лунками. Шестиугольником выделен большой фрагмент Bst-ДНК-полимеразы, овалом указана никирующая эндонуклеаза.

Оставшиеся 12 фрагментов ДНК собирали в другом мультиплексном эксперименте.

Метод обладает достаточно высокой точностью вследствие эффективного удаления несовершенных дуплексов. Точность сборки целевых фрагментов ДНК увеличилась в 6.48 раза (с 14.25 до 2.20 ошибок на 1000 п.н.), в 12.85 раза увеличилась и доля конструкций, не содержащих ошибок (с 3.23 до 41.51%), по сравнению с нефракционированными олигонуклеотидами.

Применимость упрощенного метода сборки генетических конструкций из олигонуклеотидных пулов оценили путем успешного *de novo* синтеза генов метаболического пути каротиноида ликопена. Синтезированы 10 генов с оптимизированными кодонами (891–2412 п.н. всего 11.8 т.п.н.).

С использованием струйного синтезатора получены наборы олигонуклеотидов в отдельных лунках, составляющие генетическую конструкцию длиной 0.5—1 т.п.н. [82—84]. На чипе такие наборы физически отделены друг от друга, что исключает необходимость их разделения с помощью амплификации. Синтез олигонуклеотидов ведется на силикагельных спотах размером в 150 мкм. На стандартном слайде размером 25 × 25 мм размещали 30 лунок, содержащих 361 спот, что позволяло синтезировать 10830 различных олигонуклеотидов на всем слайде.

Синтезируемые 85-членные олигонуклеотиды включают 60-звенную конструкционную часть и 25-членный адаптор, содержащий сайт расщепления никирующей эндонуклеазы. После окончания синтеза и удаления защитных групп олигонуклеотиды остаются иммобилизованными в своих лунках. Затем эти ячейки заполняют реакционной смесью для амплификации и сборки гена. Большой фрагмент Bst-ДНК-полимеразы (указан шестиугольником на рис. 6), используют для постройки комплементарной цепи с вытеснением ранее синтезированной последовательности. Никирующая эндонуклеаза (указана овалом на рис. 6) отщепляет конструкционную часть олигонуклеотида универсального праймера (отмечен штриховкой на рис. 6). После завершения амплификации проводят сборку гена в ячейке с помощью РСА. Для гидролиза несовершенных дуплексов используют Surveyor-нуклеазу. Обработка нуклеазой снижает уровень ошибок в гене на порядок – с 1.9 до 0.19 на 1000 п.н.

С помощью этого метода с целью повышения уровня экспрессии гена  $lacZ\alpha$  синтезирован набор вариантов этого гена, различающихся использованием синонимичных кодонов. Синтезированы также 74 версии генов антигенов дрозофилы, содержащие различные варианты кодонов. Продукция белков, кодируемых этими генами, изменялась в пределах 0–60% от массы общих клеточных белков.

С целью выделения олигонуклеотидов, требуемых для сборки конкретного гена, предложено фракционировать олигонуклеотидный пул с использованием водно-масляных эмульсий и парамагнитных шариков [85, 86]. Пул олигонуклеотидов превращали в ДНК-дуплексы и формировали одноцепочечные выступающие 5'-концы, одинаковые для олигонуклеотидов одного гена. Каждый шарик содержит одноцепочечный баркод для выделения олигонуклеотидов, подлежащих сборке в целевой ген. Олигонуклеотиды амплифицировали в эмульсии на поверхности шариков, из них ферментативно выделяли фрагменты для сборки целевых генов и с помощью РСА собирали гены. Этим методом синтезирована библиотека из 5775 гомологов гена дигидрофолатредуктазы и 1152 гомологов гена фосфопантетеинаденилилтрансферазы. Себестоимость каждого из генов (450-675 п.н.), полученных данным методом, составляет 1-2 \$.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одно из основных направлений использования олигонуклеотидов, полученных на микрочиповых синтезаторах — создание больших библиотек вариантов нуклеотидных последовательностей. Такие библиотеки используют при изучении структурных и функциональных характеристик тысяч *цис*регуляторных элементов, отвечающих за транскрипционные, трансляционные и другие процессы в клетках млекопитающих, бактерий и дрожжей. Синтетические библиотеки, полученные из олигонуклеотидов, могут быть полезными при изучении сплайсинга, эпигенетических механизмов и в направленном мутагенезе [13–35].

Чрезвычайно эффективно использование этих олигонуклеотидов для получения библиотек генов для нужд белковой инженерии. Стоимость синтеза одного гена из такой библиотеки примерно на два порядка меньше, чем при получении гена с использованием олигонуклеотидов, полученных на традиционных синтезаторах. Целенаправленное варьирование кодонов позволяет получать штаммы с высокой экспрессией нужного гена [82—84].

Разработка методов конструирования библиотек генов из олигонуклеотидов, полученных с помощью микрочиповых синтезаторов [65–68, 74, 77–79, 81–86], в сочетании с развитыми способами комбинирования ДНК-дуплексов [42–45] дает основу для получения сложных генетических конструкций в интересах синтетической биологии.

На сегодняшний день микрочиповые синтезаторы, по-видимому, являются единственными эффективными инструментами конструирования элементов реестра стандарных блоков (Registry of Standard Biological Parts) [87] для нужд синтетической биологии.

Примеры конструирования полных геномов на основе олигонуклеотидных пулов еще не опубликованы, но, несомненно, это дело недалекого будущего.

Развитие высокопроизводительных методов получения генетического материала в России сдерживалось отсутствием отечественных микрочиповых синтезаторов, поскольку экспорт зарубежных синтезаторов в нашу страну запрещен. Учитывая важность развития нового направления (синтетической биологии) для нужд современной фундаментальной и прикладной науки в Сибирском отделении РАН создан консорциум из нескольких институтов (ИХБФМ СО РАН. ИФП СО РАН, НИОХ СО РАН, ИАиЭ СО РАН) для создания макета микрочипового синтезатора олигонуклеотидов. В настоящее время эта работа успешно завершена [88]. Сконструированный макет открывает возможность развития синтетической биологии в нашей стране. Он позволяет синтезировать до 12000 олигонуклеотидов в одном эксперименте, может использовать как фотолабильные амидиты, так и фотокислоты.

Написание обзора не потребовало специального финансирования.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Marchisio M.A. (2018) Introduction in Synthetic Biology. Springer.
- 2. Smolke C., Lee S.Y., Nielsen J., Stephanopoulos G. (2018) *Synthetic Biology: Parts, Devices and Applications.* Germany: Wiley-VCH.
- Fodor S.P., Read J.L., Pirrung M.C., Stryer L., Lu A.T., Solas D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*. 251, 767–773.
- Pease A.C., Solas D., Sullivan E.J., Cronin M.T., Holmes C.P., Fodor S.P. (1994) Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 5022–5026.
- 5. Beaucage S.L., PIyer R. (1992) Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Tetrahedron*. **48**(12), 2223–2311.
- Singh-Gasson S., Green R.D., Yue Y., Nelson C., Blattner F., Sussman M.R., Cerrina F. (1999) Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat. Biotechnol.* 17, 974–978.
- Gao X., LeProust E., Zhang H., Srivannavit O., Gulari E., Yu P., Nishiguchi C., Xiang Q., Zhou X. (2001) A flexible light-directed DNA chip synthesis gated by deprotection using solution photogenerated acids. *Nucl. Acids Res.* 29, 4744.
- http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/nimble\_programs\_datasheet.pdf.
- Baum M., Bielau S., Rittner N., Schmid K., Eggelbusch K., Dahms M., Schlauersbach A., Tahedl H., Eeier M., Guimil R., Scheffler M., Hermann C., Funk J., Wixmerten A., Rebscher H., Hönig M., Andreae C., Büchner D., Moschel E., Glathe A., Jäger E., Thom M., Greil A., Bestvater F., Obermeier F., Burgmaier J., Thome K., Weichert S., Hein S., Binnewies T., Foitzik V., Müller M.J., Stähler C.F., Stähler P.F. (2003) Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. *Nucl. Acids Res.* 31, e151.
- Maurer K., Cooper J., Caraballo M., Crye J., Suciu D., Ghindilis A., Leonetti J.A., Wang W., Rossi F.M., Stöver A.G., Larson C., Gao H., Dill K., McShea A. (2006) Electrochemically generated acid and its containment to 100 micron reaction areas for the production of DNA microarrays. *PLoS One.* 1, e34.
- Blanchard A.P., Kaiser R.J., Hood L.E. (1996) Highdensity oligonucleotide arrays. *Biosens. Bioelectron.* 11, 687–690.
- Hughes T.R., Mao M., Jones A.R., Burchard J., Marton M.J., Shannon K.W., Lefkowitz S.M., Ziman M., Schelter J.M., Meyer M.R., Kobayashi S., Davis C., Dai H., He Y.D., Stephaniants S.B., Cavet G., Walk-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

er W.L., West A., Coffey E., Shoemaker D.D., Stoughton R., Blanchard A.P., Friend S.H., Linsley P.S. (2001) Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat. Biotechnol.* **19**, 342–347.

- Cleary M.A., Kilian K., Wang Y., Bradshaw J., Cavet G., Ge W., Kulkarni A., Paddison P.J., Chang K., Sheth N., Leproust E., Coffey E.M., Burchard J., McCombie W.R., Linsley P., Hannon G.J. (2004) Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel *in situ* oligonucleotide synthesis. *Nat. Meth.* 1(3), 241–248.
- Root D.E., Hacohen N., Hahn W.C., Lander E.S., Sabatini D.M. (2006) Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. *Nat. Meth.* 3(9), 715–719.
- Johns N.I., Gomes A.L.C., Yim S.S., Yang A., Blazejewski T., Smillie C.S., Smith M.B., Alm E.J., Kosuri S., Wang H.H. (2018) Metagenomic mining of regulatory elements enables programmable species-selective gene expression. *Nat. Methods.* 15(5), 323–329.
- Kosuri S., Goodman D.B., Cambray G., Mutalik V.K., Gao Y., Arkin A.P., Endy D., Church G.M. (2013) Composability of regulatory sequences controlling transcription and translation in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 14024–14029.
- Patwardhan R.P., Lee C., Litvin O., Young D.L., Pe'er D., Shendure J. (2009) High-resolution analysis of DNA regulatory elements by synthetic saturation mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* 27(12), 1173–1175.
- Schlabach M.R., Hu J.K., Li M., Elledge S.J. (2010) Synthetic design of strong promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 2538–2543.
- 19. Urtecho G., Tripp A.D., Insigne K.D., Kim H., Kosuri S. (2019) Systematic dissection of sequence elements controlling  $\sigma$ 70 promoters using a genomically-encoded multiplexed repor. *Biochemistry*. **58**(11), 1539–1551.
- Sharon E., Kalma E., Sharp A., Raveh-Sadka T., Levo M., Zeevi D., Keren L., Yakhini Z., Weinberg A., Segal E. (2012) Inferring gene regulatory logic from highthroughput measurements of thousands of systematically designed promoters. *Nat. Biotechnol.* **30**, 521– 530.
- Melnikov A., Murugan A., Zhang X., Tesileanu T., Wang L., Rogov P., Feizi S., Gnirke A, Callan C.G. Jr, Kinney J.B., Kellis M., Lander E.S., Mikkelsen T.S. (2012) Systematic dissection and optimization of inducible enhancers in human cells using a massively parallel reporter assay. *Nat. Biotechnol.* 30, 271–277.
- Kheradpour P., Ernst J., Melnikov A., Rogov P., Wang L., Zhang X., Alston J., Mikkelsen T.S., Kellis M. (2013) Systematic dissection of regulatory motifs in 2000 predicted human enhancers using a massively parallel reporter assay. *Genome Res.* 23, 800–811.
- Kwasnieski J.C., Mogno I., Myers C.A., Corbo J.C., Cohen B.A. (2012) Complex effects of nucleotide variants in a mammalian *cis*-regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 19498–19503.
- White M.A., Myers C.A., Corbo J.C., Cohen B.A. (2013) Massively parallel *in vivo* enhancer assay reveals that highly local features determine the *cis*-regulatory function of ChIP-seq peaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 11952–11957.
- Smith R.P., Taher L., Patwardhan R.P., Kim M.J., Inoue F., Shendure J., Ovcharenko I., Ahituv N. (2013) Massively parallel decoding of mammalian regulatory

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

sequences supports a flexible organizational model. *Nat. Genet.* **45**(9), 1021–1028.

- Sun H.H., Zhu C., Wu Y., Guo J.-F. (2009) *De novo* synthesis and assembly of multiplex riboswitches *in vitro*. *Biotechnol. Prog.* 25(5), 1228–1235.
- 27. Cheung R., Insigne K.D., Yao D., Burghard C.P., Wang J., Hsiao Y.-H.E., Jones E.M., Goodman D.B., Xiao X., Kosuri S. (2019) A multiplexed assay for exon recognition reveals that an unappreciated fraction of rare genetic variants cause large-effect splicing disruptions. *Mol. Cell.* **73**(1), 183–194.e8.
- Kaplan N., Moore I.K., Fondufe-Mittendorf Y., Gossett AJ., Tillo D., Field Y., LeProust E.M., Hughes T.R., Lieb J.D., Widom J., Segal E. (2009) The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature.* 458, 362–366.
- Sadhu M.J., Bloom J.S., Day L., Siegel J.J., Kosuri S., Kruglyak L. (2018) Highly parallel genome variant engineering with CRISPR/Cas9. *Nat. Genet.* 50(4), 510– 514.
- Smith J.D., Schlecht U., Xu W., Suresh S., Horecka J., Proctor M.J., Aiyar R.S., Bennett R.A., Chu A., Li Y.F., Roy K., Davis R.W., Steinmetz L.M., Hyman R.W., Levy S.F., Onge R.P. (2017) A method for highthroughput production of sequence-verified DNA libraries and strain collections. *Mol. Systems Biol.* 13(913), 1–15.
- Bonde M.T., Kosuri S., Genee H.J., Sarup-Lytzen K., George M. G.M., Sommer M.O.A, Wang H.H. (2015) Direct mutagenesis of thousands of genomic targets using microarray-derived oligonucleotides. *Synth. Biol.* 4, 17–22.
- Jones E.M., Lubock N.B., Venkatakrishnan A.J., Wang J., Tseng A.M., Paggi J.M., Latorraca N.R., Cancilla D., Satyadi M., Davis J.E., Babu M.M., Dror R.O., Kosuri S. (2020) Structural and functional characterization of G protein-coupled receptors with deep mutational scanning. *eLife*. 9, e54895.
- Goodman D.B., Church G.M., Kosuri S. (2013) Causes and effects of N-terminal codon bias in bacterial genes. *Science*. 342, 475–479.
- 34. Quan J., Saaem I., Tang N., Ma S., Negre N., Gong H., White K.P., Tian J. (2011) Parallel on-chip gene synthesis and application to optimization of protein expression. *Nat. Biotechnol.* 29, 449–452.
- 35. Davis J.E., Insigne K.D., Jones E.M., Hastings Q.A., Boldridge W.C., Kosuri S. (2020) Dissection of c-AMP response element architecture by using genomic and episomal massively parallel reporter assays. *Cell Systems.* **11**(1), 75–85, e7
- 36. Agarwal K.L., Büchi H., Caruthers M.H., Gupta N., Khorana H.G., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., Rajbhandary U.L., Van de Sande J.H., Sgaramella V., Weber H., Yamada T. (1970) Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature*. 227, 27–34.
- 37. Sekiya T., Takeya T., Brown E.L., Belagaje R., Contreras R., Fritz H.J., Gait M.J., Lees R.G., Ryan M.J., Khorana H.G., Norris K.E. (1979) Total synthesis of a tyrosine suppressor transfer RNA gene. XVI. Enzymatic joinings to form the total 207-base pair-long DNA. *J. Biol. Chem.* 254, 5787–5801.
- Au L.C., Yang F.Y., Yang W.J., Lo S.H., Kao C.F. (1998) Gene synthesis by a LCR-based approach: highlevel production of leptin-L54 using synthetic gene in

Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 248, 200–203.

- 39. Bang D., Church G.M. (2008) Gene synthesis by circular assembly amplification. *Nat. Methods.* **5**, 37–39.
- 40. Stemmer W.P., Crameri A., Ha K.D., Brennan T.M., Heyneker H.L. (1995) Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene.* **164**, 49–53.
- Gibson D.G. (2009) Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* 37, 6984–6990.
- Gibson D.G. (2012) Oligonucleotide assembly in yeast to produce synthetic DNA fragments. *Methods Mol. Biol.* 852, 11–21.
- 43. Dormitzer P.R., Suphaphiphat P., Gibson D.G., Wentworth D.E., Stockwell T.B., Algire M.A., Alperovich N., Barro M., Brown D.M., Craig S., Dattilo B.M., Denisova E.A., De Souza I., Eickmann M., Dugan V.G., Ferrari A., Gomila R.C., Han L., Judge C., Mane S., Matrosovich M., Merryman C., Palladino G., Palmer G.A., Spencer T., Strecker T., Trusheim H., Uhlendorff J., Wen Y., Yee A.C., Zaveri J., Zhou B., Becker S., Donabedian A., Mason P.W., Glass J.I., Rappuoli R., Venter J.C. (2013) Synthetic generation of influenza vaccine viruses for rapid response to pandemics. *Sci. Transl. Med.* 5, 185ra168.
- Gibson D.G., Smith H.O., Hutchison C.A. III, Venter J.C., Merryman C. (2010) Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nat. Methods.* 7, 901–903.
- Tang N., Ma S., Tian J. (2013) New tools for cost-effective DNA synthesis. In: *Synthetic Biology*. Ed. Zhao H. Acad. Press, 3–21.
- Carr P.A., Church G.M. (2009) Genome engineering. *Nat. Biotechnol.* 27, 1151–1162.
- Czar M.J., Anderson J.C., Bader J.S., Peccoud J. (2009) Gene synthesis demystified. *Trends Biotechnol.* 27, 63–72.
- Xiong A.S., Peng R.H., Zhuang J., Gao F., Li Y., Cheng Z.M., Yao Q.H. (2008) Chemical gene synthesis: strategies, softwares, error corrections, and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 522–540.
- Larsen L.S.Z., Wassman C.D., Hatfield G.W., Lathrop R.H. (2008) Computationally optimised DNA assembly of synthetic genes. *Int. J. Bioinform. Res. Appl.* 4, 324–336.
- Cello J., Paul A.V., Wimmer E. (2002) Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*. 297, 1016–1018.
- Smith H.O., Hutchison C.A. 3rd, Pfannkoch C., Venter J.C. (2003) Generating a synthetic genome by whole genome assembly: φX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(26), 15440–15445.
- Noyce R.S., Lederman S., Evans D.H. (2018) Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One*. 19(13), e0188453.
- 53. Gibson D.G., Benders G.A., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E.A., Baden-Tillson H., Zaveri J., Stockwell T.B., Brownley A., Thomas D.W., Algire M.A., Merryman C., Young L., Noskov V.N., Glass J.I., Venter J.C. Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O. (2008) Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a

Mycoplasma genitalium genome. Science. **319**, 1215–1220.

- 54. Gibson D.G., Glass J.I., Lartigue C., Noskov V.N., Chuang R.Y., Algire M.A., Benders G.A., Montague M.G., Ma L., Moodie M.M., Merryman C., Vashee S., Krishnakumar R., Assad-Garcia N., Andrews-Pfannkoch C., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O. (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. **329**, 52–56.
- 55. Venetz J.E., Medico L.D., Wölfle A., Schächle P., Bucher Y., Appert D., Tschan F., Flores-Tinoco C.E., van Kooten M., Guennoun R., Deutsch S., Christen M., Christen B. (2019) Chemical synthesis rewriting of a bacterial genome to achieve design flexibility and biological functionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**(16), 8070–8079.
- 56. Matzas M., Stähler P.F., Kefer N., Siebelt N., Boisguérin V., Leonard J.T., Keller A., Stähler C.F., Häberle P., Gharizadeh B., Babrzadeh F., Church G.M. (2010) High-fidelity gene synthesis by retrieval of sequence-verified DNA identified using high-throughput pyrosequencing. *Nat. Biotechnol.* 28(12), 1291–1294.
- 57. Stähler P.F., Carapito R., Stähler C.F., Malzas M., Leonard J.T., Jäger J., Beier M. (2010) Patent WO No. 2010/094772 Al. Geneva, Switzerland World Intellectual Property Organization International Bureau.
- Stähler P.F., Carapito R., Stähler C.F., Malzas M., Leonard J.T., Jäger J., Beier M. (2018) Patent US No. US 2017/0267999 A1. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- 59. Lee H., Kim H., Kim S., Ryu T., Kim H., Kwon D.B.S. (2015) A high-throughput optomechanical retrieval method for sequence-verified clonal DNA from the NGS platform. *Nat. Commun.* 6, 6073.
- Bang D., Kim H., Cho N., Lim H., Park S., Han H. (2020) Patent US No. 10526640 B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Smith J.D., Schlecht U., Xu W., Suresh S., Horecka J., Proctor M.J., Aiyar R.S. (2010) A method for high throughput production of sequence verified DNA libraries and strain collections. *Mol. Systems Biol.* 13(2), 913.
- 62. Kim H., Han H., Ahn J., Lee J., Cho N., Jang H., Kim H., Kwon S., Bang D. (2012) Shotgun DNA synthesis for the high-throughput construction of large DNA molecules. *Nucl. Acids Res.* **40**(18), e140.
- Bang D., Kim H., Han H. (2019) Patent US No. 10358642
  B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- 64. Schwartz J.J., Lee C., Shendure J. (2012) Accurate gene synthesis with tag-directed retrieval of sequence-verified DNA molecules. *Nat. Methods*. **9**(9), 913–915.
- 65. Oleinikov A.V. (2004) Patent WO No. 2004/024886 A2. Geneva, Switzerland World Intellectual Property Organization International Bureau.
- Tian J., Gong H., Sheng N., Zhou X., Gulari E., Gao X., Church G. (2004) Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature*. 432, 1050–1054.
- 67. Church G.M., Jingdong Tian J. (2005) Patent WO No. 2005/089110 A2. Geneva, Switzerland World Intellectual Property Organization International Bureau.
- 68. Church G.M., Jingdong T.J. (2006) Patent US No. 2006/0127920 A1. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

576

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

- Richmond K.E., Li M.-H., Rodesch M.J., Patel M., Lowe A.M., Kim C., Chu L.L., Venkataramaian N., Flickinger S.F., Kaysen J., Belshaw P.J., Sussman M.R., Cerrina F. (2004) Amplification and assembly of chipeluted DNA (AACED): a method for high-throughput gene synthesis. *Nucl. Acids Res.* 32, 5011–5018.
- Kim C., Kaysen J., Richmond K., Rodesch M., Binkowski B., Chu L., Li M., Heinrich K., Blair S., Belshaw P., Sussman M., Cerrina F. (2006) Progress in gene assembly from a MAS-driven DNA microarray. *Microelectronic Engineering*. 83, 1613–1616.
- Zhou X., Cai S., Hong A., You Q., Yu P., Sheng N., Srivannavit O., Muranjan S., Rouillard J.M., Xia Y., Zhang X., Xiang Q., Ganesh R., Zhu Q., Matejko A., Gulari E., Gao X. (2004) Microfluidic PicoArray synthesis of oligodeoxynucleotides and simultaneous assembling of multiple DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 32, 5409–5417.
- 72. Ma Q., Li S. (2017) US Patent No. US 9695417 B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Kim H., Jeong J., Bang D. (2011) Hierarchical gene synthesis using DNA microchip oligonucleotides. *J. Biotechnol.* 151, 319–324.
- Borovkov A.Y., Loskutov A.V., Robida M.D., Day K.M., Cano J.A., Olson T.L., Patel H., Brown K, Hunter P.D., Sykes K.F. (2010) High-quality gene assembly directly from unpurified mixtures of microarray-synthesized oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* 38(19), e180.
- 75. Zhou X., Cai S., Hong A., You Q., Yu P., Sheng N., Srivannavit O., Muranjan S., Rouillard J.M., Xia Y., Zhang X., Xiang Q., Ganesh R., Zhu Q., Matejko A., Gulari E., Gao X. (2004) Microfluidic PicoArray synthesis of oligodeoxynucleotides and simultaneous assembling of multiple DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 32, 5409–5417.
- Kosuri S., Church G.M. (2014) Large-scale *de novo* DNA synthesis: technologies and applications. *Nat. Meth.* 11(5), 499–507.
- 77. Kosuri S., Eroshenko N., LeProust E., Super M., Way J., Li J.B., George M., Church G.M. (2010) Scalable gene synthesis by selective amplification of DNA pools from

high-fidelity microchips. *Nat. Biotechnol.* 28, 1295–1299.

- Church G.M., Kosuri S., Eroshenko N. (2014) Patent US No. US 2014/0045728A1. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Church G.M., Kosuri S., Eroshenko N. (2012) Patent WO No. 2012/154201 Al. Geneva, Switzerland World Intellectual Property Organization International Bureau.
- Xu Q., Schlabach M.R., Hannon G.J., Elledge S.J. (2009) Design of 240000 orthogonal 25mer DNA barcode probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 2289– 2294.
- Wan W., Lu M., Wang D., Gao X., Hong J. (2017) High-fidelity *de novo* synthesis of pathways using microchip synthesized oligonucleotides and general molecular biology equipment. *Sci. Rep.* 7(1), 6119.
- 82. Tian J. (2018) Patent US No. US 2018 / 0080069 A1. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- 83. Tian J. (2013) Patent EP 2 826 862 A1. Munich, Germany European Patent Office.
- Quan J., Saaem I., Tang N., Ma S., Negre N., Gong H., White K.P., Tian J. (2011) Parallel on-chip gene synthesis and application to optimization of protein expression. *Nat. Biotechnol.* 29, 449–452.
- Plesa C., Sidore A.M., Lubock N.B., Zhang D., Kosuri S. (2018) Multiplexed gene synthesis in emulsions for exploring protein functional landscapes. *Science*. 359(6373), 343–347.
- Sidore A.M., Plesa C., Samson J.A., Lubock N.B., Kosuri S. (2020) DropSynth 2.0: high-fidelity multiplexed gene synthesis in emulsions. *Nucl. Acids Res.* 48(16), e95.
- Canton B., Labno A., Endy D. (2008) Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nat. Biotechnol*, 26, 787–793.
- 88. Синяков А.Н., Бессмельцев В.П., Камаев Г.Н. (2018) Микрочиповый синтезатор ДНК. II. Всероссийская научно-практическая конференция "Научное приборостроение – современное состояние и перспективы развития". Казань 4–7 июня. Сб. материалов конференции. с. 280–282.

# APPLICATION ARRAY-BASED OLIGONUCLEOTIDES FOR SYNTHESIS OF GENETIC DESIGNS

### A. N. Sinyakov<sup>1, \*</sup>, V. A. Ryabinin<sup>1</sup>, and E. V. Kostina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

### \*e-mail: sinyakov@niboch.nsc.ru

In the review application array-based oligonucleotides in biological studies is described. The main application for an array-based oligonucleotides is a design a large libraries of variants of nucleotide sequences. Such libraries are used at studies of splicing, protein-nucleic acid interactions, transcriptional, translational and other regulatory processes in mammalian, yeast and bacterial systems. Development of the methods of genes library design made with array-based nucleotides coupled with advanced methods of a combination of DNAduplexes gives a basis for engineering of complex genetic designs for of synthetic biology.

Keywords: oligonucleotides, pool, microarrays, gene synthesis, cloning, high-throughput sequencing

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 612.8

# ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРА ГРЕЛИНА GHS-R1a В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ (МИНИ-ОБЗОР)

© 2021 г. М. И. Айрапетов<sup>а, b, \*</sup>, С. О. Ереско<sup>а, c</sup>, А. А. Лебедев<sup>а</sup>, Е. Р. Бычков<sup>а</sup>, П. Д. Шабанов<sup>а, d</sup>

<sup>а</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия <sup>b</sup>Cанкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, 194100 Россия <sup>c</sup>Cанкт-Петербург, 197022 Россия <sup>d</sup>Boeнно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044 Россия \*e-mail: interleukin1b@gmail.com Поступила в редакцию 06.01.2021 г. После доработки 24.02.2021 г. Принята к публикации 25.02.2021 г.

В обзоре представлены данные об экспрессии рецептора грелина GHS-R1a в структурах головного мозга разных модельных объектов (*Danio rerio*, грызуны, приматы), а также в мозге человека. Локализация GHS-R1a в различных структурах головного мозга указывает на участие рецептора во многих физиологических процессах. На различных моделях показано, что GHS-R1a участвует в регуляции про- и противовоспалительного ответа, апоптоза и пролиферации клеток. Известно, что рецептор грелина играет важную роль в пищевом поведении, а также вовлечен в патогенетические механизмы ожирения, наркомании, алкоголизма. Ведутся исследования с применением различных терапевтических средств (агонистов и антагонистов рецептора), которые могут использоваться в фармакокоррекции указанных патологических состояний. Рассмотрены гипотетические механизмы внутриклеточной сигнализации, реализуемой при участии GHS-R1a, однако полное понимание этих механизмов на данный момент не достигнуто. Грелиновые внутриклеточные пути, по-видимому, специфичны для определенной области мозга и, вероятно, зависят также от метаболического или стрессового статуса организма.

**Ключевые слова:** грелин, GHS-R1a, головной мозг, *Danio rerio*, грызуны, приматы, человек **DOI:** 10.31857/S0026898421040029

### введение

Со времени открытия рецептора грелина (GHS-R1a, Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a) прошло более 20 лет, однако этот рецептор до сих вызывает повышенный интерес. Каждый год появляются новые данные о физиологических процессах, немаловажную роль в которых играет GHS-R1a. Большое внимание привлекают механизмы пищевого поведения, в которых принимает участие GHS-R1a, а также вклад этого рецептора в различные формы аддиктивного поведения (наркомания, алкоголизм, игровая зависимость и др.) [1–3]. Многочисленные данные свидетельствуют о вовлеченности рецептора в механизмы развития нейродегенеративного процесса при различных патологических состояниях головного мозга, включая болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [4, 5]. При этом немаловажно, что грелин выполняет противонейровоспалительную и нейропротекторную роль [6-8]. Кроме того, показано участие грелина и его рецептора в механизмах стресса, приводящего к поведенческим и психопатологическим нарушениям [9, 10].

Представленность рецептора грелина, в различных структурах головного мозга указывает на возможную многофункциональность и самого грелина [11–17].

### ГРЕЛИН И ЕГО РЕЦЕПТОР GHS-R1a Грелин

Грелин — это пептидный гормон, который секретируется в наибольшем количестве клетками желудка млекопитающих. Известны две формы грелина: ацилированная и неацилированная (дезацилгрелин). Ацилированный грелин образуется путем ацетилирования по остатку серина в положении 3 (Ser3) грелин-О-ацилтрансферазой. Присутствие ацильного остатка необходимо для связывания грелина с его рецептором GHS-R1a в цен-

тральной нервной системе (ЦНС), дезацилгрелин с GHS-R1a не связывается [18, 19]. Предполагается, что ацетилирование происходит непосредственно перед связыванием ацетилированных форм грелина с GHS-R1a [20]. Дезацилгрелин представляет собой наиболее стабильную и долгоживущую форму грелина, циркулирующую в плазме крови. Неацилированную форму грелина первоначально считали предшественником или продуктом метаболизма ацилированной формы, однако в последнее время дезацилгрелину отводят особую роль в организме [21]. Относительное содержание дезацилгрелина в суммарном пуле грелина достигает 60-90%, тогда как ацилированный грелин составляет до 10% от общего содержания грелина [22]. Кроме того, ацилированный грелин быстро разрушается в образцах плазмы или сыворотки, а его точное количественное определение часто связано с некоторыми методическими трудностями [23, 24].

#### GHS-R1a

Рецептор к ацилированному грелину (GHS-R1a) впервые описали А.Д. Говард с коллегами в 1996 году. GHS-R1a входит в семейство метаботропных рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR) [25] – универсальных белков с семью трансмембранными доменами, которые регулируют разнообразные внутриклеточные сигналы в ответ на гормоны, нейротрансмиттеры, ионы, фотоны, одоранты и другие раздражители. Рецепторы этого подтипа играют важную роль в клеточных процессах и рассматриваются в качестве привлекательной мишени для разработки лекарственных средств. Рецепторы GPCR нельзя описать как простые бимодальные переключатели типа "включено-выключено", но их следует рассматривать как высокодинамичные системы, которые существуют во множестве функционально различных конформаций. Более того, лиганды могут регулировать активность рецептора, изменяя его конформацию, и тем самым оказывать влияние на запуск внутриклеточных сигнальных каскадов в том или ином направлении [26].

Белок GHS-R1a крысы состоит из 364 аминокислотных остатков, которые формируют семь трансмембранных доменов. Сравнение полных аминокислотных последовательностей гомологов GHS-R1a крысы, свиньи и человека выявило высокую степень их идентичности (96.1% у крысы и человека). Ген рецептора GHS-R содержит два экзона, один из которых кодирует домены 1–5, а второй – домены 6 и 7. Существование двух типов GHS-R человека и свиньи (типы 1a и 1b) объясняется их происхождением в результате альтернативного сплайсинга пре-мРНК одного гена. Полный белок GHS-R1, состоящий из семи доменов, кодируется мРНК типа 1a, из которой удаляется интрон, локализованный между двумя экзонами гена *GHS-R* [27].

В головном мозге GHS-R1a локализуется на плазматической мембране нейронов, астроцитов и олигодендроцитов [28–30]. Несмотря на то, что GHS-R1a широко экспрессируется периферическими иммунными клетками (моноциты, макрофаги, Т-клетки), экспрессия GHS-R1a не выявлена на резидентных макрофагах нервной системы (микроглия) [28, 31, 32].

С использованием агонистов и антагонистов GHS-R1a показано, что активация рецептора приводит к изменению многих каскадов внутриклеточных реакций (см. рис. 1). Такие внутриклеточные пути, по-видимому, специфичны для определенной области мозга и, вероятно, зависят от метаболического или стрессового статуса индивида, а также от микроокружения, которое содержит различные сигнальные молекулы [9, 33]. Так, взаимодействие GHS-R1a с лигандом активирует сигнальный путь Gall/q – фосфолипаза C, что приводит к гидролизу фосфатидилинозитолдифосфата (PIP2) и, как следствие, к высвобождению инозитол-3-фосфата (IP3) и диацилглицерина (DAG). При этом GHS-R1а также связан с сигнальным путем Gαi/o.

На различных моделях показано, что активация GHS-R1a приводит к повышению уровня фосфорилирования SERK и AKT, тогда как уровень фосфорилирования JNK и p38MAPK преимущественно снижается [2, 8, 20, 30, 34–37]. Активация грелиновой сигнализации приводит к снижению уровня оксида азота [36]. Изменение уровня фосфорилирования различных протеинкиназ приводит и к изменению активности различных факторов транскрипции, которые регулируют экспрессию самых разных генов; грелиновая сигнализация вовлечена в изменение уровня экспрессии про- и противовоспалительных генов, а также генов, связанных с пролиферацией и апоптозом [1, 2, 8, 20, 30, 34–37].

Известно также, что GHS-R1a образует гомои гетеродимеры с другими рецепторами, что влияет на активность GHS-R1a [38]. GHS-R1a образует комплекс с рецептором GHS-R1b, который локализуется на мембранах эндоплазматический сети, что приводит к интернализации GHS-R1a и снижению связывания лигандов с ним. Когда экспрессия GHS-R1b превышала экспрессию GHS-R1a, наблюдалось снижение экспрессии GHS-R1a на клеточной поверхности с последующим снижением активности фосфатидилинозитол-специфичной фосфолипазы С (PI-PLC) [38]. GHS-R1a образует гетеродимеры и с другими GP-СR-рецепторами [39]. Образование гетеродимеров GHS-R1a с DRD1 (рецептор D1 дофамина) и активация DRD1 приводят к неканонической передаче сигнала по пути Gaq/11. Высказано пред-



Рис. 1. Сигнальные каскады GHS-R1a в клетках головного мозга. ГОАТ – грелин-О-ацилтрансфераза; АС – аденилатциклаза; PLC – фосфолипаза С; DAG – диацилглицерин; IP3 – инозитол-3-фосфат; PIP2 – фосфатидилинозитдифосфат; DRD – рецептор дофамина; 5HT2c – рецептор серотонина; MRAP2 – вспомогательный белок к рецепторам меланокортина.

положение, что разрушение этих гетеродимеров может быть механизмом развития болезни Альцгеймера [40, 41]. GHS-R1a способен образовывать димеры с DRD2, а также с рецепторами 5HT2с, меланокортина (MC3R, MC4R), соматостатина и окситоцина [42, 43].

В последнее время появляется все больше данных о так называемой лиганднезависимой активности GHS-R1a, т.е. об активном конформационном состоянии рецептора в отсутствие лигандов. Предполагается, что эта активность важна для протекания многих физиологических процессов [44, 45].

Активация 5HT2с в составе димеров 5HT2с/ GHS-R1a приводит к ингибированию вызванной грелином передачи сигналов по пути Gaq/11, тогда как блокирование 5HT2с усиливает передачу сигналов GHS-R1a и вызванной грелином передачи сигналов [46]. Анализ *in vitro* показывает, что GHS-R1a и MRAP-2 образуют комплексы, которые усиливают вызванную грелином передачу сигналов через Gaq/11 [47]. Последние данные свидетельствуют о том, что экспрессирующийся в печени антимикробный пептид 2 (LEAP2) – эндогенный лиганд GHS-R1a – регулирует передачу внутриклеточных сигналов грелина [48–51].

### ЭКСПРЕССИЯ GHS-R1a В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Экспрессию GHS-R1a изучали в головном мозге разных модельных организмов, таких как *Danio rerio*, мыши, крысы, приматы, а также человека.

Аквариумная рыбка *D. rerio*. хорошо зарекомендовала себя в качестве модельного объекта, в том числе, и в нейробиологии. Установлено, что грелин экспрессируется в панкреатических эндокринных клетках *D. rerio*. С помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени показано, что zGHS-R1 (вариант, аминокислотная последовательность которого незначительно отличается от GHS-R1a млекопитающих), экспрессируется на высоком уровне в тканях мозга. Экспрессия GHS-R1a выявлена и в мозге таких рыб, как тилапия, черный морской лещ, золотая рыбка и карп. Однако полагают, что было бы неплохо в дальнейшем определить уровень экспрессии zGHS-R1 в различных отделах головного мозга *D. rerio* [52, 53].

В наибольших концентрациях мРНК GHS-R1a представлена в гипоталамусе (супрахиазматическое ядро, вентромедиальное ядро, паравентрикулярное ядро и др.) и гипофизе крыс и мышей. Высокий уровень мРНК рецептора грелина выявлен также в зубчатой извилине гиппокампа, полях СА1, СА2 и СА3 гиппокампа, а также в ядрах ствола мозга (черная субстанция, вентральная тегментальная область, дорсальное ядро шва, двигательное ядро лицевого нерва, латеральное парабрахиальное ядро, *nucleus ambiguus*), небольшое количество мРНК обнаружено в пириформной коре мозга мышей и крыс. Имеются сведения об экспрессии мРНК GHS-R1a в ядрах таламуса крысы [11, 12]. мРНК грелина и GHS-R обнаружены и в сенсомоторной коре головного мозга крыс [13], Позднее показали, что GHS-R1a экспрессируется в нескольких регионах миндалевидного тела крысы [14].

Высокие уровни экспрессии мРНК GHS-R1a выявлены в гипофизе и гипоталамусе; умеренные – в таламусе, коре головного мозга, в мосту, продолговатом мозге и обонятельной луковице; низкие – в мозжечке и периферических тканях морской свинки (*Cavia porcellus*). Распределение экспрессии GHS-R1a в головном мозге морской свинки было почти таким же, как у крыс. При этом распределение GHS-R1a в периферических тканях морских свинок и крыс различалось [54].

Французские исследователи обнаружили мРНК GHS-R1a в гипофизе, гипоталамусе, гиппокампе и коре мозжечка четырех взрослых лемуров (*Microcebus murinus*) [55].

Нами найдена всего одна работа, в которой анализировали уровень мРНК GHS-R1a у человека. мРНК GHS-R1a выявлена в гипофизе, гипоталамусе и гиппокампе, однако в этой работе сделан вывод, что невозможность обнаружить мРНК GHS-R1a в других областях мозга связана, скорее всего, с ее низкой концентрацией [11].

Представленность GHS-R1a в различных структурах головного мозга (табл. 1), показанная на различных модельных объектах, указывает на участие этого рецептора во многих физиологических и патологических процессах.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные на различных модельных объектах с помошью молекулярно-генетических и гистохимических методов данные свидетельствуют о широкой локализации GHS-R1a в различных структурах головного мозга, чем и объясняется вовлеченность рецептора грелина во многие физиологические процессы. Несмотря не некоторые отличия в характере распределения экспрессии рецептора на периферии, наблюдается большое сходство в распределении GHS-R1a в структурах головного мозга модельных организмов, таких как грызуны, приматы, а также у человека. Таким образом, изучение механизмов грелиновой сигнализации на головном мозге грызунов вполне оправдано, учитывая сходство картины распределения экспрессии GHS-R1a в структурах головного мозга. Изучение и понимание механизмов грелиновой сигнализации может открыть новые подходы к фармакокоррекции тех многочисленных патологических состояний нервной системы, немаловажную роль в которых играет GHS-R1a.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания по теме "Фармакологический анализ действия нейротропных средств, изучение внутриклеточных мишеней и создание систем направленной доставки" (шифр 0557-2019-0004).

Настоящая статья не содержит описания какихлибо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Отдел головного мозга	Крыса	Мышь	Приматы	Человек	Ссылка
Пириформная кора	+/-	+/-	?	?	[11, 12]
Сенсомоторная кора	+	?	?	?	[13]
Гиппокамп	+	+/	+	+	[11, 12, 55]
Амигдала	+	?	?	?	[14]
Гипоталамус	+	+	+	+	[11, 12, 54, 55]
Ядра таламуса	+/-	?	?	?	[11, 12]
Средний мозг	+	+	?	?	[11, 12]
ВТА (вентральная тегментальная область)	+	+	?	+/-	[11, 12]
Черная субстанция	+	+	?	+/-	[11, 12]
Ядра ствола мозга	+	+	?	?	[11, 12]
Мозжечок	+	?	+	?	[51, 52]
Гипофиз	+	+	+	+	[54, 55]

Таблица 1. Экспрессия GHS-R1a в структурах головного мозга

Примечание. "+" – наличие экспрессии, "+/-" – противоречивые данные, "?" – нет данных.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Smith R.G., Thorner M.O. (2012) *Ghrelin in Health and Disease*. New York: Springer Sci. Business Media.
- Akalu Y., Molla M.D., Dessie G., Ayelign B. (2020) Physiological effect of ghrelin on body systems. *Int. J. Endocrinol.* 2020, 1385138. https://doi.org/10.1155/2020/1385138
- Shabanov P.D., Airapetov M.I., Sekste E.A., Khokhlov P.P., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Vinogradov P.M., Roik R.O., Pavlenko V.P. (2014) Serum unacylated ghrelin concentrations and expression of GHSR mRNA in the rat brain structures after chronic alcoholization and ethanol withdrawal. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24(S2), 653.
- Suda Y., Kuzumaki N., Sone T., Narita M., Tanaka K., Hamada Y., Iwasawa C., Shibasaki M., Maekawa A., Matsuo M., Akamatsu W., Hattori N., Okano H., Narita M. (2018) Down-regulation of ghrelin receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra contributes to Parkinson's disease-like motor dysfunction. *Mol. Brain.* 11(1), 6.
- Jeon S.G., Hong S.B., Nam Y., Tae J., Yoo A., Song E.J., Kim K.I., Lee D., Park J., Lee S.M., Kim J.I., Moon M. (2019) Ghrelin in Alzheimer's disease: pathologic roles and therapeutic implications. *Ageing Res. Rev.* 55, 100945.
- Tian J., Guo L., Sui S., Driskill C., Phensy A., Wang Q., Du H. (2019) Disrupted hippocampal growth hormone secretagogue receptor 1α interaction with dopamine receptor D1 plays a role in Alzheimer's disease. *Sci. Translat. Med.* 11(505), 1–14.
- Buntwal L., Sassi M., Morgan A.H., Andrews Z.B., Davies J.S. (2019) Ghrelin-mediated hippocampal neurogenesis: implications for health and disease. *Trends Endocrinol Metab.* **30**(11), 844–859.
- 8. Shi L., Du X., Jiang H., Xie J. (2017) Ghrelin and neurodegenerative disorders-a review. *Mol. Neurobiol.* **54**(2), 1144–1155.
- Guo L., Niu M., Yang J., Li L., Liu S., Sun Y., Zhou Z., Zhou Y. (2019) GHS-R1a deficiency alleviates depression-related behaviors after chronic social defeat stress. *Front. Neurosci.* 13, 364.
- 10. Fritz E.M., Singewald N., Bundel D.D. (2020) The good, the bad and the unknown aspects of ghrelin in stress coping and stress-related psychiatric disorders. *Front. Synaptic Neurosci.* **12**, 594484.
- Guan X.M., Yu H., Palyha O.C., McKee K.K., Feighner S.D., Sirinathsinghji D.J.S., Howard A.D. (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 48(1), 23–29.
- 12. Zigman J.M., Jones J.E., Lee C.E., Saper C.B., Elmquist J.K. (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **494**(3), 528–548.
- 13. Hou Z., Miao Y., Gao L., Pan H., Zhu S. (2006) Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat. *Regul. Pept.* **134**(2–3), 126–131.
- Alvarez-Crespo M., Skibicka K.P., Farkas I., Molnár C.S., Egecioglu E., Hrabovszky E., Liposits Z., Dickson S.L. (2012) The amygdala as a neurobiological target for

ghrelin in rats: neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence. *PLoS One*. **7**(10), 46321.

- Jang J.K., Kim W.Y., Cho B.R., Lee J.W., Kim J.H. (2017) Locomotor sensitization is expressed by ghrelin and D1 dopamine receptor agonist in the *nucleus accumbens* core in amphetamine pre-exposed rat. *Addict. Biol.* 23(3), 849–856.
- Sustkova-Fiserova M., Puskina N., Havlickova T., Lapka M., Syslova K., Pohorala V., Charalambous C. (2019) Ghrelin receptor antagonism of fentanyl-induced conditioned place preference, intravenous selfadministration, and dopamine release in the *nucleus accumbens* in rats. *Addict. Biol.* 25(6), 1–10.
- 17. Vestlund J., Bergquist F., Eckernäs D., Licheri V., Adermark L., Jerlhag E. (2019) Ghrelin signalling within the rat *nucleus accumbens* and skilled reach foraging. *Psychoneuroendocrinology*. **106**, 183–194.
- Ansari D., Gustafsson A., Andersson R. (2015) Update on the management of pancreatic cancer: surgery is not enough. *World J. Gastroenterol.* 21(11), 3214–3222.
- 19. Sato T., Nakamura Y., Shiimura Y., Ohgusu H., Kangawa K., Kojima M. (2011) Structure, regulation and function of ghrelin. *J. Biochem.* **151**(2), 119–128.
- 20. Abizaid A., Hougland J.L. (2019) Ghrelin signaling: GOAT and GHS-R1a take a LEAP in complexity. *Trends Endocrinol. Metab.* **31**(2), 107–117.
- 21. Rauh M., Groschl M., Rascher W. (2007) Simultaneous quantification of ghrelin and desacyl-ghrelin by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in plasma, serum, and cell supernatants. *Clin. Chem.* **53**(5), 902–910.
- Kempinski R., Demissie M., Jasinska M., Paradowski L. (2008) Plasma ghrelin concentration in celiac patients. *Gastroenterologia Polska*. 15(6), 375–377.
- Bednarek M.A., Feighner S.D., Pong S.S., McKee K.K., Hreniuk D.L., Silva M.V., Heck J.V. (2000) Structurefunction studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. J. Med. Chem. 43(23), 4370–4376.
- Hosoda H., Doi K., Nagaya N., Okumura H., Nakagawa E., Enomoto M., Ono F., Kangawa K. (2004) Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples. *Clin. Chem.* 50(6), 1077–1080.
- 25. Howard A.D., Feighner S.D., Cully D.F., Arena J.P., Liberator P.A., Rosenblum C.I., Hamelin M., Hreniuk D.L., Palyha O.C., Anderson J., Paress P.S., Diaz C., Chou M., Liu K.K., McKee K.K., Pong S.S., Chaung L.Y., Elbrecht A., Dashkevicz M., Heavens R., Rigby M., Sirinathsinghji D.J., Dean D.C., Melillo D.G., Patchett A.A., Nargund R., Griffin P.R., DeMartino J.A., Gupta S.K., Schaeffer J.M., Smith R.G., Van der Ploeg L.H. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 273(5277), 974–977.
- 26. Hilger D., Masureel M., Kobilka B.K. (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**(1), 4–12.
- McKee K.K., Palyha O.C., Feighner S.D., Hreniuk D.L., Tan C.P., Phillips M.S., Smith R.G., Van der Ploeg L.H., Howard A.D. (1997) Molecular analysis of rat pituitary

582

and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol. Endocrinol.* **11**(4), 415–423.

- Moon M., Kim H.G., Hwang L., Seo J.H., Kim S., Hwang S., Park S. (2009) Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *Neurotox. Res.* 15(4), 332–347.
- Dong R., Chen M., Liu J., Kang J., Zhu S. (2019) Temporospatial effects of acyl-ghrelin on activation of astrocytes after ischaemic brain injury. *J. Neuroendocrinol.* 31(7), 12767.
- Lee J.Y., Oh T.H., Yune T.Y. (2011) Ghrelin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes via ERK and p38MAPK signaling. *Endocrinology*. **152**(6), 2377–2386.
- Baatar D., Patel K., Taub D.D. (2011) The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 340(1), 44–58.
- 32. Bulgarelli I., Tamiazzo L., Bresciani E., Rapetti D., Caporali S., Lattuada D., Torsello A. (2009) Desacylghrelin and synthetic GH-secretagogues modulate the production of inflammatory cytokines in mouse microglia cells stimulated by beta-amyloid fibrils. *J. Neurosci. Res.* 87(12), 2718–2727.
- 33. Song G., Zhu Q., Han F., Liu S., Zhao C., Zhou Y. (2018) Local infusion of ghrelin into the lateral amygdala blocks extinction of conditioned taste aversion in rats. *Neurosci. Lett.* 662, 71–76.
- Chung H., Li E., Kim Y., Kim S., Park S. (2013) Multiple signaling pathways mediate ghrelin-induced proliferation of hippocampal neural stem cells. *J. Endocrinol.* 218(1), 49–59.
- Wang G., Wang W., Zhao J., Ni Y., Zhou X., Zhang W. (2011) Ghrelin prevents neuronal apoptosis and cognitive impairments in sepsis-associated encephalopathy. *Neuroreport.* 22(18), 959–964.
- Zeng M., Huang C., Zheng H., Chen Q., He W., Deng Y. (2018) Effects of ghrelin on iNOS-derived NO promoted LPS-induced pulmonary alveolar epithelial A549 cells apoptosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 49(5), 1840– 1855.
- 37. Zheng H., Liang W., He W., Huang C., Chen Q., Yi H., Zeng M. (2019) Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury by inhibiting the NF-κB, iNOS, and Akt signaling in alveolar macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **317**(3), 381–391.
- Leung P.K., Chow K.B.S., Lau P.N., Chu K.M., Chan C.B., Cheng C.H.K., Wise H. (2007) The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cell. Signal.* 19(5), 1011–1022.
- Wellman M., Abizaid A. (2015) Growth hormone secretagogue receptor dimers: a new pharmacological target. *eNeuro*. 2(2), 1–16.
- Kern A., Mavrikaki M., Ullrich C., Albarran-Zeckler R., Brantley A.F., Smith R.G. (2015) Hippocampal dopamine/DRD1 signaling dependent on the ghrelin receptor. *Cell.* 163(5), 1176–1190.
- Tian J., Guo L., Sui S., Driskill C., Phensy A., Wang Q., Du H. (2019) Disrupted hippocampal growth hormone secretagogue receptor 1α interaction with dopamine

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

receptor D1 plays a role in Alzheimer's disease. *Sci. Transl. Med.* **11**(505), 1–29.

- 42. Schellekens H., Dinan T.G., Cryan J.F. (2013) Taking two to tango: a role for ghrelin receptor heterodimerization in stress and reward. *Front. Neurosci.* **7**, 148.
- Damian M., Pons V., Renault P., M'Kadmi C., Delort B., Hartmann L., Kaya A.I., Louet M., Gagne D., Salah K.B.H., Denoyelle S., Ferry G., Boutin J.A., Wagner R., Fehrentz J.A., Martinez J., Marie J., Floquet N., Galès C., Mary S., Hamm H.E., Banères J.L. (2018) GHSR-D2R heteromerization modulates dopamine signaling through an effect on G protein conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115(17), 4501–4506.
- 44. Mear Y., Enjalbert A., Thirion S. (2013) GHS-R1a constitutive activity and its physiological relevance. *Front. Neurosci.* **7**, 87.
- 45. Ribeiro L.F., Catarino T., Carvalho M., Cortes L., Santos S.D., Opazo P.O., Ribeiro L.R., Oliveiros B., Choquet D., Esteban J.A., Peça J., Carvalho A.L. (2021) Ligand-independent activity of the ghrelin receptor modulates AMPA receptor trafficking and supports memory formation. *Sci. Signal.* 14(670), 19–53.
- Schellekens H., De Francesco P.N., Kandil D., Theeuwes W.F., McCarthy T., Oeffelen W.E., Cryan J.F. (2015) Ghrelin's orexigenic effect is modulated via a serotonin 2C receptor interaction. ACS Chem. Neurosci. 6(7), 1186–1197.
- 47. Srisai D., Yin T.C., Lee A.A., Rouault A.A.J., Pearson N.A., Grobe J.L., Sebag J.A. (2017) MRAP2 regulates ghrelin receptor signaling and hunger sensing. *Nat. Commun.* **8**(1), 713.
- Ge X., Yang H., Bednarek M.A., Galon-Tilleman H., Chen P., Chen M., Kaplan D.D. (2018) LEAP2 is an endogenous antagonist of the ghrelin receptor. *Cell Metab.* 27(2), 461–469.
- 49. Mani B.K., Puzziferri N., He Z., Rodriguez J.A, Osborne-Lawrence S., Metzger N.P., Chhina N., Gaylinn B., Thorner M.O., Thomas E.L., Bell J.D., Williams K.W., Goldstone A.P., Zigman J.M. (2019) LEAP2 changes with body mass and food intake in humans and mice. *J. Clin. Invest.* **129**(9), 3909–3923.
- M'Kadmi C., Cabral A., Barrile F., Giribaldi J., Cantel S., Damian M., Fehrentz J.A. (2018) N-terminal liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP2) region exhibits inverse agonist activity toward the ghrelin receptor. *J. Med. Chem.* 62, 965–973.
- Wang J.H., Li H.Z., Shao X.X., Nie W.H., Liu Y.L., Xu Z.G., Guo Z.Y. (2019) Identifying the binding mechanism of LEAP2 to receptor GHSR1a. *FEBS J.* 286, 1332–1345.
- 52. Eom J., Hong A., Kang Y.H., Yoo H.J., Chang E.J., Kang S.W., Song Y. (2014) Molecular cloning, regulation, and functional analysis of two *GHS-R* genes in zebrafish. *Exp. Cell. Res.* **326**(1), 10–21.
- Cai W., Yuan X., Yuan Y., Xie S., Gong Y., Su H., Qiao Y. (2015) Sequence, genomic organization and expression of ghrelin receptor in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 179, 54–61.
- 54. Kitazawa T., Nakamura T., Saeki A., Teraoka H., Hiraga T., Kaiya H. (2011) Molecular identification of ghrelin receptor (GHS-R1a) and its functional role in

the gastrointestinal tract of the guinea-pig. *Peptides*. 32(9), 1876-1886.

55. Mitchell V., Bouret S., Beauvillain J.C., Schilling A., Perret M., Kordon C., Epelbaum J. (2001) Comparative distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in *Microcebus murinus* (Primate, lemurian) and rat forebrain and pituitary. *J. Comp. Neurol.* **429**(3), 469–489.

# EXPRESSION OF THE GHRELIN RECEPTOR GHS-R1a IN THE BRAIN (MINI-REVIEW)

M. I. Airapetov<sup>1, 2, \*</sup>, S. O. Eresko<sup>1, 3</sup>, A. A. Lebedev<sup>1</sup>, E. R. Bychkov<sup>1</sup>, and P. D. Shabanov<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, 197376 Russia
 <sup>2</sup> Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, 194100 Russia
 <sup>3</sup> Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petersburg, 199034 Russia
 <sup>4</sup> Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, 194044 Russia
 \*e-mail: interleukin1b@gmail.com

The review presents data on the expression of the ghrelin receptor GHS-R1a in the structures of the brain, obtained using various model objects (*Danio rerio*, rodents, primates), human. Studies show the wide localization of GHS-R1a among the structures of the brain, which indicates the involvement of the receptor in many physiological processes. On various models, information has been obtained regarding the participation of the receptor in the mechanisms of regulation of the pro- and anti-inflammatory response, apoptosis and proliferation. It is known that the ghrelin receptor plays an important role in eating behavior and is also involved in the pathogenetic mechanisms of obesity, drug addiction, and alcoholism. With this in mind, research is underway with the use of various therapeutic agents (receptor agonists and antagonists) that can be used for the pharmacological correction of these pathological conditions. The review also presents hypothetical mechanisms of intracellular signaling, realized with the participation of GHS-R1a; however, a complete understanding of these mechanisms has not yet been reached. The ghrelin intracellular pathways seem to be specific to the brain region and, probably, also depend on the metabolic or stress status of the organism.

Keywords: ghrelin, GHS-R1a, brain, Danio rerio, rodents, primates, humans

\_\_\_\_\_ ОБЗОРЫ \_\_\_\_

УЛК 577.1

## МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКА ШИПА ДЛЯ ВАКЦИН ПРОТИВ ОБОЛОЧЕЧНЫХ РНК-ВИРУСОВ

© 2021 г. А. Н. Взоров<sup>а, b,</sup> \*, Е. И. Самохвалов<sup>а</sup>, В. В. Чебаненко<sup>b</sup>, Д. В. Щебляков<sup>*а*</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>*а*, *с*</sup>

<sup>а</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия <sup>b</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Москва, 119234 Россия

<sup>с</sup>Кафедра инфектологии и вирусологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия \*e-mail: anvzorov@mail.ru

Поступила в релакцию 04.03.2021 г. После доработки 22.03.2021 г. Принята к публикации 22.03.2021 г.

Большинство вакцин работает за счет индукции нейтрализующих антител, нацеленных на внешнюю поверхность вирусов. Оболочечные РНК-содержащие вирусы развили механизмы ускользания от иммунного ответа, ассоциированные с их поверхностными гликопротеинами, которые могут сильно различаться друг от друга на уровне вирусных штаммов. Естественная инфекция и вакцины, содержащие природные формы поверхностных мембранных белков, вызывают образование нейтрализующих антител широкого спектра действия, но из-за низкого уровня их эффективность оставляет желать лучшего. Оболочечные PHK-содержащие вирусы, такие как ВИЧ-1, вирус гриппа A, SARS-CoV-2, содержат мембранные белки слияния (fusion proteins) первого типа, формирующие особые стабилизированные конформации при взаимодействии с клеткой. Модификация поверхностных вирусных белков, закрепляющая такие конформации, приводит к увеличению содержания нейтрализующих антител с широким спектром действия и позволяет преодолеть проблемы, связанные с ускользанием и высокой изменчивостью природного антигена.

Ключевые слова: оболочечные PHK-вирусы, SARS-CoV-2, ВИЧ-1, вирус гриппа A, белок шипа, гемагглютинин, Env, механизм слияния, нейтрализующие антитела, вакцины DOI: 10.31857/S0026898421040157

В XX веке большинство вакцин было разработано по традиционным технологиям, включаюшим такие этапы, как вылеление патогена, его инактивация и иммунизация, а также основанных на использовании вирусных белков в природной форме [1]. Однако для "победы" над новыми патогенами, в основном из-за высокой изменчивости их геномов и конформационной гибкости поверхностных гликопротеинов, необходимы новые подходы. Следует заметить, что безопасность вакцин, содержащих цельные инактивированные вирионы, ниже, чем субъединичных – в состав которых входят отдельные вирусные компоненты.

### РАСПРОСТРАНЕНИЕ РНК-ВИРУСОВ

Большинство РНК-содержащих вирусов человека считаются зоонозными или имеют зоонозное происхождение [2]. ВИЧ-1, вирус гриппа А и SARS-CoV-2 представляют собой оболочечные вирусы с РНК-геномом. Благодаря высокой изменчивости, они преодолели видовой барьер, проникли в человеческую популяцию и адаптировались к человеку (табл. 1). Эпидемическое распространение новых вирусов, скорее всего, связано с увеличением плотности населения, урбанизацией, развитием транспорта, поведением и адаптацией вирусов к человеку. Сейчас мировое сообщество охвачено одним из самых значительных за последнее десятилетие кризисов в системе здравоохранения. Появление нового РНК-содержащего оболочечного вируса SARS-CoV-2, вызывающего COVID-19, стало одной из ведущих причин повышения смертности в мире. Геном SARS-CoV-2 сходен как с SARS-CoV (79%), так и с MERS-CoV (50%), но наиболее близок двум

Сокращения: AdV (adenovirus) – аденовирус; RBD (receptor-binding domain) – рецепторсвязывающий домен.

SARS-подобными вирусами летучих мышей: bat-SL-CoVZC45 и bat-SL-CoVZXC21 (88% сходства) [3]. Новый вирус SARS-CoV-2 был официально отнесен к подроду Sarbecovirus рода *Betacoronavirus*.

### КОНФОРМАЦИОННЫЕ ФОРМЫ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ РНК-ВИРУСОВ

Основная мишень адаптивного иммунного ответа – оболочечные белки, которые у РНК-содержащих вирусов: гриппа A, SARS-CoV-2, вируса иммунодефицита обезьян (SIV)/ВИЧ – имеют обшие принципы строения. Их тримерные трансмембранные белки относятся к фьюжн-белкам первого типа с одним доменом, пересекающим мембрану [15]. В мембране вириона белки оболочки: S (SARS-CoV-2), Env (ВИЧ/SIV), НА (вирус гриппа) — участвуют в двух ключевых событиях: связывание с клеточным рецептором и индуцирование слияния вирусной и клеточной мембран (табл. 1, рис. 1). Вирусные частицы могут проникнуть в клетку, не связываясь со специфическими рецепторами – путем эндоцитоза, – но такой путь не приводит к продуктивному инфекционному циклу и образованию новых вирионов [16]. Выполнение двух событий: узнавания рецептора на поверхности клетки и слияния вирусной и клеточной мембран - приводит к проникновению вируса в клетку и запуску его репликативного цикла. При слиянии мембран гликопротеины на поверхности вириона претерпевают каскад строго регулируемых конформационных изменений, в результате чего образуются стабилизированные формы белков.

Оболочечные белки синтезируются в виде предшественников, процессинг которых приводит к образованию заякоренной в мембране субъединицы. На вновь образованном N-конце содержится гидрофобный фьюжн-пептид. Большинство фьюжнбелков класса I несет рецепторсвязывающий домен (RBD), который зажимает индуцирующий слияние домен<sup>1</sup>. Рефолдинг белка и его стабилизация запускаются только после связывания с рецептором — когда мембрана-мишень находится в пределах досягаемости. Считается, что именно стабилизированные формы имеют консервативные поверхности и несут эпитопы для нейтрализующих антител с высокой перекрестной реактивностью, а метастабильные формы скрывают их и, наоборот, выставляют более вариабельные участки, вызывающие образование ненейтрализующих антител [20, 21].

### ИММУНОГЕННОСТЬ ОБОЛОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ

Гликопротеин оболочки ВИЧ-1. ВИЧ-1 – сложный ретровирус, кодирующий, в дополнение к структурным белкам (Gag, Pol и Env), обнаруженным у всех ретровирусов, несколько акцессорных (вспомогательных) белков. Люди имеют защитный иммунитет от простых ретровирусов [22], в то время как естественная ВИЧ-инфекция не вызывает защитного иммунного ответа. Акцессорные белки ВИЧ-1 ингибируют клеточные антивирусные факторы рестрикции. Кроме того, ВИЧ присуще множество других механизмов, позволяющих ускользать от защитного ответа хозяина и даже противодействовать ему. Один из таких вирусных факторов связан с поверхностным глико-

Факторы, влияющие на распространение	Роль вирусного поверхностного гликопротеина (шипа)
Сезонный потенциал для воздушно-капельного пути передачи [4]	Отвечает за проникновение в клетку. Распознает клеточные рецепторы
Адаптация к клеткам человека [5]	Механизм изменения клеточного тропизма и модуля- ция специфичности вирусных рецепторов [6]
Бессимптомная передача	Накопление адаптационных мутаций [7–9]
Врожденный иммунитет [10]; предсуществующий иммунитет: перекрестнореагирующие антитела, перекрестный Т-клеточный иммунитет [11, 12]	Способность противодействовать антивирусному иммунитету [13]
Адаптивный иммунитет; противовирусные препараты	Способность к ускользанию от иммунного ответа и противовирусной терапии; генетическая изменчи- вость, конформационная гибкость [14]

Таблица 1. Особенности адаптации зоонозных оболочечных РНК-содержащих вирусов: ВИЧ, гриппа A, SARS-CoV-2 – к человеку-хозяину

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Примечание: Триггеры мембранного слияния (низкий pH или связывание с рецептором) уменьшают ассоциацию между поверхностным и трансмембранным (TM) доменами (субъединицами) белка шипа, позволяя TM освободиться от зажима (отдельные фрагменты белка закрывают/зажимают другие части в метастабильной форме шипа) и перенастроиться. Область, состоящая из α-спирали, изменяет конформацию, перемещая другую область TM – гидрофобный пептид слияния – по направлению к клеточной мембране.



**Рис. 1.** Структура белка шипа оболочечных вирусов. На поверхности вириона белок шипа находится в метастабильном состоянии: ВИЧ (*a*), вирус гриппа A (*b*), SARS-CoV-2 (*b*). При связывании с рецептором (*a*, *b*) или в результате изменения pH (*b*) происходит изменение конформации и образование префьюзионной формы шипа: рефолдинг поверхностной и стабилизация трансмембранной субъединиц. В префьюзионной конформации открываются дополнительные эпитопы для образования нейтрализующих антител [17–19]. Префьюзионную форму шипа можно стабилизировать введением модификации: тримеризирущей последовательности или сайт-направленным мутагенезом. FP (fusion ререйсе) – пептид слияния; EM (endosomal membrane) – мембрана эндосомы; RBD (receptor-binding domain) – рецепторсяязывающий домен; Ab – антитело.

протеином Env. Уровень нейтрализующих антител против белка Env, индуцируемых при естественном инфицировании, недостаточен для блокирования инфекции [23]. Иммуногены на основе нативных тримеров Env вызывают сильные, но штаммспецифичные нейтрализующие реакции антител на моделях животных. Однако иммуногены на основе нативных тримеров Env не способны создать условия для преодоления множества препятствий на пути выработки нейтрализующих антител широкого спектра действия, индукция которых характеризует эффективность любой вакцины [24, 25]. Вакцина, нацеленная на ингибирование стадии проникновения ВИЧ в клетку, может быть эффективной только в том случае, если она будет индуцировать выработку мощных Env-специфичных широконейтрализующих антител.

Гемагглютинин вируса гриппа А. Гемагглютинин (НА) – наиболее часто используемый компонент противогриппозных вакцин. Существует 18 различных антигенных подтипов НА вируса гриппа А [26]. Есть два основных механизма, позволяющих вирусу гриппа А уклоняться от иммунного ответа и распространяться в человеческой популяции: антигенный дрейф и антигенный сдвиг. Антигенный дрейф – результат мутаций в генах, кодирующих поверхностные гликопротеины НА и нейраминидазу (NA), которые возникают в ответ на селективное давление со стороны антител хозяина. Антигенный слвиг – появление новых штаммов вируса гриппа А в результате реассортации геномных сегментов нескольких штаммов [27]. Текущие лицензированные вакцины против гриппа содержат, либо инактивированные, либо живые аттенуированные вирусы гриппа. Защитная эффективность сезонных лицензированных вакцин меняется каждый год в зависимости от антигенного соответствия циркулирующих вирусов вакцинным штаммам и составляет от 20 до 60% [28, 29]. Хотя противогриппозные вакцины эффективны в борьбе с близкородственными вирусами, к их основным ограничениям относится необходимость обновлять их производство к каждому эпидемическому сезону, причем с некоторой долей неопределенности в правильности выбора актуальных сезонных штаммов. В случае же проникновения в человеческую популяцию пандемичных штаммов – преодолевших межвидовой барьер "первичный хозяин—человек" – разработку и процесс производства вакцины придется налаживать фактически с нуля в связи со сменой, скорее всего, субтипа вируса гриппа А.

Белок шипа SARS-CoV-2. Коронавирусам присущи механизмы генетической корректуры (genetic proofreading mechanisms) [30, 31], поэтому по сравнению с другими РНК-содержащими вирусами (например, ВИЧ) генетическая дивергентность у SARS-CoV-2 низкая [32]. Тем не менее естественный отбор может влиять на появление редких, но благоприятных для вируса мутаций. В результате проведенных филогенетических исследований выявлено, что у пациентов на фоне длительно протекающей инфекции и противовирусной терапии ускоряется эволюция генома вируса, причем замены аминокислот происходят преимущественно в белке шипа и особенно в RBD [14]. Сообшалось о пациенте, у которого на фоне лимфомы наблюдали затяжное течение COVID-19, который подтверждали положительными результатами ОТ-ПЦР в течение более 4 месяцев. Вирус за этот период приобрел 18 мутаций de novo [33]. Во многих исследованиях показано, что вариант SARS-CoV-2 с мутацией D614G в белке шипа быстро стал превалировать в человеческой популяции в ходе глобальной пандемии в 2020 году [34, 35]. Теперь новый вариант SARS-CoV-2 - В.1.1.7 - вызвал резкий рост заболеваемости сначала в Англии, а теперь по всему миру. Для В.1.1.7 характерно необычно большое число замен в геноме, которые приводят ко множеству мутаций в белке шипа. Три из них особенно настораживают. Мутация N501Y – одного из шести ключевых аминокислотных остатков RBD - идентифицирована как повышающая аффинность связывания белка шипа с человеческим и мышиным рецептором SARS-CoV-2 – ангиотензинконвертирующим ферментом-2 (ACE2). Делеция 69-70del в S-белке может влиять на уклонение вируса от иммунного ответа. Мутация Р681Н непосредственно примыкает к сайту расщепления фурином – важной детерминанте инфекционного цикла вируса [36]. В Южной Африке обнаружен еще один вариант SARS-CoV-2 – В.1.351. Хотя у В.1.351 есть мутации, общие с В.1.1.7, его появление считают независимым от английского штамма. В Бразилии появился вариант SARS-CoV-2, известный как Р.1. Этот вариант несет 17 уникальных мутаций, в том числе три в RBD белка шипа [37]. В Великобритании и Нигерии одновременно зарегистрирован новый вариант В.1.525 с двумя значимыми мутациями: E484K и F888L, – которые усиливают трансмиссивность, вирулентность SARS-CoV-2 и снижают нейтрализующее действие антител [38]. На основании анализа текущей эпидемиологической ситуации высказываются опасения, что даже при достижении коллективного иммунитета SARS-CoV-2 продолжит циркулировать в человеческой популяции и перенесенное заболевание не защитит от повторного инфицирования [39] (табл. 2). Так, геномы вируса, выделенного от больного, дважды переболевшего COVID-19, относились к разным штаммам SARS-CoV-2 [39]. Сообщалось [40], что у переболевших COVID-19 преобладают ненейтрализующие антитела и очень мало нейтрализующих к белку шипа SARS-CoV-2 (табл. 2).

Антитела, нацеленные на рецепторсвязывающий мотив (RBM), входящий в состав RBD S-бел-

ка, доминируют в гуморальном иммунном ответе у переболевших COVID-19 [43]. Иммунодоминантные эпитопы RBM индуцируют синтез антител, блокирующих связывание S-белка с рецептором. Однако мутации в иммунодоминантном эпитопе происходят намного чаше, чем в неиммунодоминантном эпитопе. Как следствие – мутантный SARS-CoV-2 легко избегает действия нейтрализующих антител. Уже показано, что ответы антител, вызванные естественной инфекцией SARS-CoV-2, охватывают широкий круг эпитопов S-белка (нейтрализующих и ненейтрализующих). Это также свойственно для поверхностного белка Env ВИЧ-1 при хронической инфекции, когда белок Env находится в "расслабленной" конформации. При начальной же инфекции Env имеет компактную форму и вызывает в основном целевой иммунный ответ, направленный на нейтрализующие эпитопы. По этой причине именно такая форма Env используется в качестве платформы для создания иммуногена для ВИЧ-вакцин [20]. Интересно, что аффинность связывания моноклональных антител с RBD белка S коронавируса, изолированного от пациентов, перенесших COVID-19, не коррелировала с их нейтрализующей способностью [44]. Так, моноклональное антитело 2M-10B11 связывалось с RBD (EC<sub>50</sub> 5 нг/мл), но не нейтрализовало аутентичный SARS-CoV-2; а 4А8, наоборот, проявляло высокую нейтрализующую активность, но не связывалось с RBD [44]. Это может быть связано с особенностями структуры и конформационными переходами в нативном белке шипа. С другой стороны, несмотря на то что, первичные структуры RBM несколько отличаются у SARS-CoV и SARS-CoV-2, эти коронавирусы с высокой аффинностью связываются с АСЕ2 как своим рецептором. Следовательно, для сарбековирусов (Sarbecovirus) характер взаимодействия RBM с АСЕ2 может варьировать от вируса к вирусу, но детально эти механизмы пока не исследованы.

Продолжение пандемии может способствовать накоплению иммунологически значимых мутаций в геноме SARS-CoV-2 и в результате при-

Δυτυτρπο	Эффективность/уровень			
Anninosia	ВИЧ-1	SARS-CoV-2		
Поликлональные (в крови)	Не способны защитить от повторного заражения	Не способны защитить от повтор- ного заражения		
Моноклональные (изолирован- ные от пациентов)	Нейтрализующие антитела с эффек- торным механизмом действия [41]	Нейтрализующие антитела с эффек- торным механизмом действия [42]		
Нейтрализующие	Низкий уровень	Низкий уровень		
Ненейтрализующие	Высокий уровень	Высокий уровень		

Таблица 2. Сравнение ответа антител к оболочечному белку у ВИЧ-1 и SARS-CoV-2 инфицированных

менения вакцин. Однако надо отметить, что естественная инфекция SARS-CoV-2 может вызывать образование нейтрализующих антител с широким спектром действия. Антитела S309, выделенные от пациента с SARS-CoV, взаимодействовали с RBD гликопротеина S и эффективно нейтрализовали как SARS-CoV, так и SARS-CoV-2 [45]. С помощью криоэлектронной микроскопии и анализа связывания выяснили, что антитела \$309 распознают эпитоп, консервативный в пределах подрода Sarbecovirus, но при этом не конкурируют с рецептором за прикрепление к RBM. Эпитоп доступен как в открытой, так и в закрытой конформации гликопротеина S [45]. Предполагается, что в нейтрализации задействован один или несколько IgG-специфичных бивалентных механизмов: перекрестное "сшивание" тримеров S-белка (между тримерами одного вириона), создание стерических препятствий или агрегация вирионов (как результат межвирионной сшивки).

На модели низших приматов Yu и др. [45] показали, что индуцированные вакциной против SARS-CoV-2 титры нейтрализующих антител коррелируют с ее протективной активностью.

### ПОДХОДЫ К МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ РНК-ВИРУСОВ

Усиление иммунного ответа антител – основная цель при создании иммуногена для противовирусной вакцины. Эффективный иммуноген может быть сконструирован с помощью механистической стратегии, основанной на структурной идентификации механизмов уклонения [46]. Использование тримерной стабилизированной формы вирусных поверхностных белков привлекает все больше внимания при дизайне иммуногенов [15]. Уже показано, что стабилизированные тримеры Env SIV/BИЧ не индуцируют "иммунных внецелевых ответов" и ненейтрализующих антител. Последние образуются на ненативные эпитопы, присутствующие в природных формах Env в составе вирусных частиц [47, 48] (табл. 3). Введение тримеризируюшей последовательности GCN4 – производной от мотива, названного лейциновой молнией (leucine zipper motif), – дрожжевого регуляторного белка GCN4 [49] в состав цитоплазматического домена (CT) Епу приводило к формированию структурного узла (bundle structure), стабилизирующего поверхностную субъединицу, и оказывало значительное влияние на функциональную активность белка Env ВИЧ и SIV, включая модуляцию экспонирования рецепторсвязывающего сайта [50, 51]. Более того, стабилизированные тримеры Env SIV/ВИЧ вызывают ответы антител с широкой нейтрализующей активностью и повышенной авидностью, в связи с чем их рассматривают как потенциальные иммуногены для вакцин с повышенной эффективностью [52].

Что касается вируса гриппа A, то W.C. Weldon и соавт. [53] уже давно показали, что на растворимой форме рекомбинантного тримера НА (sHA) с тримеризирующей последовательностью GCN4 на С-конце экспонированы нативные эпитопы, тогда как на немодифицированном белке sHA открыты эпитопы, не экспонированные в нативной молекуле [53]. Эпитопы, представленные в немодифицированном sHA, находятся в "немой зоне" ("silent face") тримера – на интерфейсе мономеров (the monomer-monomer interface) – и поэтому искажают антительный ответ. Эти эпитопы не экспонированы в составе вириона при физиологическом значении рН. Стабилизированный тример sHA оказался более эффективным иммуногеном, чем исходный, и, следовательно, может быть использован для создания противогриппозных вакцин. Эти данные еще раз подтверждают важность дизайна иммуногена на основе структурных модификаций вирусных антигенов.

Имеющиеся на сегодняшний день данные по механизму проникновения SARS-CoV-2 в хозяйскую клетку и опосредованной антителами нейтрализации этого вируса [42, 54, 55] позволяют проводить структурный дизайн иммуногенов для

**Таблица 3.** Сравнение природной и стабилизированной формы белков оболочки ВИЧ/SIV, вируса гриппа A и SARS-CoV-2

Природный белок	Стабилизированная форма
Метастабильная конформация	Одна конформация — в промежуточном состоянии "до слияния" (prefusion conformation)
Иммунная "дезориентация"	Не вызывает иммунной "дезориентации"
Экспонирование ненативных эпитопов	Экспонирование эпитопов нативного тримера
Индукция ненейтрализующих антител	Индукция антител с широким спектром активности и высокой авидностью

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

создания вакцин против высокопатогенных коронавирусов, в том числе и тех, которые могут появиться в будущем. Так, Rey & Lok [56] отмечали, что при встраивании мотива тримеризации во фьюжн-белки ВИЧ и вируса гриппа А происходит стабилизация всего тримера. У S-белка вирусов семейства *Coronaviridae* мотив тримеризании не влиял на область HR2 (С-концевой гептадный повтор-2), которая находилась в неупорядоченной конформации и не участвовала в стабилизации тримера. Для преодоления этого феномена J. Pallesen и др. [57] вводили в область HR1 MERS-CoV два остатка пролина (S-2P), что позволяло увеличить продукцию иммуногена в человеческих эпителиальных клетках в 50 раз по сравнению с нативным белком, а инлуцируемый им у иммунизированных животных уровень нейтрализующих антител значительно превосходил таковой для немодифицированной молекулы. Недавно показано, что стабилизированный введением двух остатков пролина S-белок SARS-CoV-2 становится конформационно "гомогенным" и находится в конформации "до слияния", которая имеет чувствительные к нейтрализации эпитопы [55], что важно для использования в качестве иммуногена. В префьюзионной конформации открываются дополнительные эпитопы для образования нейтрализующих антител. С высоким разрешением исследована трехмерная структура комплекса молекулы S-белка MERS-CoV с нейтрализующими антителами G4 и показана их нацеленность на область стебля (наружная часть фьюжн-белка) [57]. Кроме того, на мышах получены G4-антитела, выработанные на стабилизированную форму S-белка MERS-CoV. Эти связывающие субъединицу S2 антитела нацелены на эпитопы за пределами RBD и способны эффективно нейтрализовать вирус [19].

Модифицированная РНК-вакцина BNT162b2, колирующая полноразмерный. стабилизированный в префьюзионной конформации S-гликопротеин SARS-CoV-2, вызывала у вакцинированных людей образование широконейтрализующих антител [58]. Для изучения эффективности иммунного ответа, вызванного BNT162b2-вакциной, была получена инфекционная комплементарная ДНК (кДНК) SARS-CoV-2. На ее основе Xie и соавт. [58] сконструировали три мутантных вируса с шипами, содержащими S-белок с ключевыми мутациями из недавно появившихся британского и южноафриканского вариантов (В.1.1.7 и В.1.351 соответственно). В результате анализа панели сывороток, полученных от 20 участников клинических испытаний BNT162b2, показано, что у всех испытуемых выработались нейтрализующие антитела, причем в высоких титрах, против всех трех мутантных вирусов. И это несмотря на то, что при использовании плазмы крови от переболевших COVID-19 мутант

501Y.V2 иногда полностью ускользал от действия нейтрализующих антител [59].

### ВАКЦИНЫ ПРОТИВ SARS-CoV-2 НА ОСНОВЕ S-БЕЛКА

В настояшее время в клинических испытаниях вакцин против COVID-19 участвует 48 вакцинкандидатов [60]. Надо отметить, что только в некоторых из них в качестве иммуногена фигурирует S-белок [61-64]: либо в полноразмерной форме [61, 64], либо в усеченной [63]. Описаны и различные модификации, такие как делеция сайта протеолитического расшепления [65, 66], включение двух (или более) стабилизирующих мутаций [62, 65] или доменов тримеризации [67]. В большинстве разработок для доставки в клетки и экспрессии S-белка используют аденовирусные векторы (AdV) или недавно разработанные PHKвакшины. Опубликованные ланные локлинических исследований ряда кандидатных РНК-вакцин позволяют оптимистично смотреть в будущее [62, 68]. Однако РНК-технология – это новая отрасль биотехнологии, поэтому при крупномасштабном производстве могут возникнуть и прогнозируемые, и непрогнозируемые сбои. Так, производители вакцины Pfizer vже столкнулись с проблемой стабильности при долгосрочном хранении и обеспечении транспортной холодовой цепи с температурой -70°С. Кроме того, РНК-вакцины вводят путем инъекций, поэтому они вряд ли способны вызвать сильный иммунитет на слизистых дыхательных путей и конъюктиве – входных воротах SARS-CoV-2.

Аденовирусные векторы могут быть произведены в больших количествах и более стабильны, чем РНК-вакцины, и для их хранения не требуются низкие температуры. AdV-векторы эффективно стимулируют ответ как В-, так и Т-клеток, но могут частично нейтрализоваться уже предсушествующим иммунитетом против аденовируса. Возраст и предсуществующий иммунитет к аденовирусу типа 5 (AdV5) у участников клинических испытаний оказались факторами, которые влияли на безопасность и иммуногенность вакцины-кандидата [69]. Появление лихорадки ассоциировалось с уменьшением возраста и низким уровнем иммунного ответа на вакцинный вектор на основе AdV5 – Ad5. Оказалось, что у пожилых людей, с большей вероятностью "встречавшихся" с AdV5 в течение жизни, уровень нейтрализующих антител к Ad5 был гораздо выше, чем у молодежи. Следовательно, возрастная популяция может быть более толерантной к вакцине на основе Ad5-вектора.

Ввиду высокой распространенности AdV5-серопозитивных людей во всем мире в состав вакцин против SARS-CoV-2 вводят альтернативные векторы. К ним относятся AdV редких серотипов: 11, 26, 35 и 49 [70], — которые можно использовать в схемах последовательного прайм-буста [61]. Так, при исследовании сывороток участников клинических испытаний вакцины на основе двух рекомбинантных AdV-векторов: rAd26 и rAd5 обнаружено, что наличие предсуществующего иммунитета к этим аденовирусам не влияло на титр антител к RBD S-белка SARS-CoV-2 [61]. Возможно, это связано с высоким титром аденовирусных частиц в используемой вакцине: 10<sup>11</sup> на одну дозу для каждого из двух рекомбинантых вирусов [61]. Есть и другое предположение — короткий временной интервал (до 5 минут) для прикрепления частиц AdV к мембране и проникновению в клетку [71].

По имеющимся сейчас результатам испытаний вакцин против SARS-CoV-2 можно говорить о том, что вакцины с S-белком в качестве иммуногена [61, 64, 72] создают защиту от 70 до 93% [73]. Однако пока нет ответа на вопрос: "Какая форма S-белка обеспечит наиболее высокую эффективность вакцины против COVID-19, в том числе против появляющихся новых штаммов SARS-CoV-2?"

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Быстрое распространение вирусов может быть обусловлено легкостью передачи от хозяина к хозяину, предрасположенностью к мутационному сдвигу/дрейфу и ускользанием новых иммунных вариантов вируса от нейтрализующих антител. Способность антител нейтрализовать вирус или усиливать инфекцию обусловлена множеством параметров, таких как специфичность, концентрация, аффинность и изотип [74–76]. Гипотетически SARS-CoV-2 можно рассматривать как результат природного антигенного сдвига SARS-CoV, поскольку геномные последовательности этих вирусов идентичны на 79% и репертуар кодируемых белков сходен [77]. Есть риск, что новые, появившиеся в результате дрейфа циркулирующих, штаммы коронавируса будут ускользать от иммунного ответа, выработанного на родительский вирус или на вакцину против него, — как вирус гриппа уклоняется от антител, индуцированных сезонными вакцинами [78]. Это связано с тем, что сезонные вакцины могут вызывать образование неэффективных слабо нейтрализующих антител к новым эпитопам мутировавшего вируса [79]. Также ответ антител зависит от того, насколько эпитоп на поверхности вирусной частицы доступен для связывания с антителами. На поверхности ВИЧ иммунодоминантные эпитопы вызывают образование ненейтрализующих антител. Это один из механизмов ускользания ВИЧ от иммунной системы хозяина – иммунодоминантные эпитопы "отвлекают внимание" В-клеток от функциональных сайтов тримеров, которые

проникновение вируса в клетку. Рецепторсвязывающий мотив, RBM, SARS-CoV-2 - основная мишень для нейтрализующих антител [43]. Это жизненно важный сайт для вируса и его доступность для нейтрализующих антител, вероятно, играет двоякую роль. Эпитопы в составе RBM подвержены естественному мутагенезу, что в конечном итоге позволяет вирусу ускользать от нейтрализации антителами. Возможно, во время длительных инфекций это приводит к дрейфу антигенов – аналогично тому, который происходит у вируса гриппа А. Именно поэтому для антителиндуцирующих вакцин очень важно использовать модифицированный S-белок с открытыми консервативными эпитопами (неиммунодоминантными). Несмотря на явные различия по своему строению и путям передачи, ВИЧ, вирус гриппа А и SARS-CoV-2 обладают и общими свойствами. У этих вирусов сходен механизм проникновения в клетку и вирусные детерминанты этого процесса тоже сходны – это поверхностные гликопротеины, узнающие свой рецептор на клетке-хозяине и индуцирующие слияние вирусной оболочки и клеточной мембраны. У ВИЧ, вируса гриппа А и SARS-CoV-2 стабилизация белка слияния и открытие консервативной поверхности - ключевой механизм для образования антител, необходимых для защиты [56]. Возможно, новые структурные данные позволят оценить функциональную значимость мутаций в S-белке, которые возникают по мере генетического дрейфа циркулирующего SARS-CoV-2, и помогут сопоставить их с участками известных, доступных для антител, эпитопов у стабилизированного S-

труднодоступны для антител. У вируса гриппа А

и SARS-CoV-2 иммунодоминантные эпитопы

индуцируют образование антител, блокирующих

тивных вакцин. Авторы благодарны М.И. Букринскому за полезные дискуссии в ходе написания обзора.

белка. Эта информация поможет создать точный

дизайн иммуногена и ускорит разработку эффек-

Написание настоящего обзора не потребовало специального финансирования.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rappuoli R. (2004) From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nat. Med.* 10(11), 1177–1185. https://doi.org/10.1038/nm1129
- 2. Woolhouse M.E.J., Adair K., Brierley L. (2013) RNA viruses: a case study of the biology of emerging infec-

tious diseases. *Microbiol. Spectr.* **1**(1). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.OH-0001-2012

- Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 395, 565–574.
- Herfst S., Bohringer M., Karo B., Lawrence P., Lewis N.S., Mina M.J., Russell C.J., Steel J., de Swart R.L., Menge C. (2017) Drivers of airborne human-to-human pathogen transmission. *Curr. Opin. Virol.* 22, 22–29.
- Vzorov A.N., Weidmann A., Kozyr N.L., Khaoustov V., Yoffe B., Compans R.W. (2007) Role of the long cytoplasmic domain of the SIV Env glycoprotein in early and late stages of infection. *Retrovirology*. 4, 94. https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-94
- Vzorov A.N., Yang C., Compans R.W. (2015) An amphipathic sequence in the cytoplasmic tail of HIV-1 Env alters cell tropism and modulates viral receptor specificity. *Acta Virol.* 59(3), 209–220.
- Marx P.A., Alcabes P.G., Drucker E. (2001) Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356(1410), 911–920.
- Walls A.C., Park Y.-J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 181, 281–292. e6.
- Li W., Zhang C., Sui J., Kuhn J.H., Moore M.J., Luo S., Wong S.K., Huang I.C., Xu K., Vasilieva N., Murakami A., He Y., Marasco W.A., Guan Y., Choe H., Farzan M. (2005) Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* 24, 1634–1643.
- Meffre E., Iwasaki A. (2020) Interferon deficiency can lead to severe COVID. *Nature*. **587**(7834), 374–376. https://doi.org/10.1038/d41586-020-03070-1
- Ng K., Faulkner N., Cornish G., Rosa A., Harvey R., Hussain S., Ulferts R., Earl C., Wrobel A., Benton D., Roustan C., Bolland W., Thompson R., Agua-Doce A., Hobson P., Heaney J., Rickman H., Paraskevopoulou S., Houlihan C.F., Thomson K., Sanchez E., Brealey D., Shin G.Y., Spyer M. J., Joshi D., O'Reilly N., Walker P. A., Kjaer S., Riddell A., Moore C., Jebson B.R., Wilkinson M., Marshall L.R., Rosser E.C., Radziszewska A., Peckham H., Ciurtin C., Wedderburn L.R., Beale R., Swanton C., Gandhi S., Stockinger B., McCauley J., Gamblin S., McCoy L.E., Cherepanov P., Nastouli E., Kassiotis G. (2020) Pre-existing and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science*. 370, 1339–1343.
- Altmann D.M., Boyton R.J. (2020) SARS-CoV-2 T cell immunity: specificity, function, durability, and role in protection. *Sci. Immunol.* 5, eabd6160.
- 13. Exline C.M., Yang S.J., Haworth K.G., Rengarajan S., Lopez L.A., Droniou M.E., Seclen E., Cannon P.M.

(2015) Determinants in HIV-2 Env and tetherin required for functional interaction. *Retrovirology.* **12**, 67. https://doi.org/10.1186/s12977-015-0194-0

- 14. Choi B., Choudhary M.C., Regan J., Sparks J.A., Padera R.F., Qiu X., Solomon I.H., Kuo H., Boucau J., Bowman K., Adhikari U.D., Winkler M.L., Mueller A.A., Hsu T., Desjardins M., Baden L.R., Chan B.T., Walker B.D., Lichterfeld M., Brigl M., Kwon D.S., Kanjilal S., Richardson E.T., Jonsson A.H., Alter G., Barczak A.K., Hanage W.P., Yu X.G., Gaiha G.D., Seaman M.S., Cernadas M., Li J.Z. (2020) Persistence and evolution of SARS-CoV-2 in an immunocompromised host. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2291–2293.
- Waning D.L., Russell C.J., Jardetzky T.S., Lamb R.A. (2004) Activation of a paramyxovirus fusion protein is modulated by inside-out signaling from the cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**(25), 9217– 9222.
- Bosch B., Grigorov B., Senserrich J., Clotet B., Darlix J., Muriaux D., Este J.A. (2008) A clathrin–dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell–T cell transmission. *Antiviral Res.* 80(2), 185–193.
- Huang J., Kang B.H., Pancera M., Lee J.H., Tong T., Feng Y., Imamichi H., Geogiev I.S., Chuang G., Druz A., Doria-Rose N.A., Laub L., Sliepen K., van Gils M.J., de la Pena A.T., Derking R., Klasse P., Migueles S.A., Bailer R.T., Alam M., Pugach P., Haynes B.F., Barton F., Wyatt R.T., Sanders R.W., Binley J.M., Ward A.B., Mascola J.R., Kwong P.D., Connors M. (2014) Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41-gp120 interface. *Nature*. 515, 138– 142.
- Neerukonda S.N., Vassell R., Weiss C.D. (2020) Neutralizing antibodies targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. *Vaccines* (Basel). 8(3), 382. https://doi.org/10.3390/vaccines8030382
- Wang L., Shi W., Joyce M.G., Modjarrad K., Zhang Y., Leung K., Lees C.R., Zhou T., Yassine H.M., Kanekiyo M., Yang Z., Chen X., Becker M.M., Freeman M., Vogel L., Johnson J.C., Olinger G., Todd J.P., Bagci U., Solomon J., Mollura D.J., Hensley L., Jahrling P., Denison M.R., Rao S.S., Subbarao K., Kwong P.D., Mascola J.R., Kong W., Graham B.S. (2015) Evaluation of candidate vaccine approaches for MERS-CoV. *Nat. Commun.* 6, 7712. https://doi.org/10.1038/ncomms8712
- 20. Burton D.R., Hangartner L. (2016) Broadly neutralizing antibodies to HIV and their role in vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 635–659.
- Pancera M., Changela A., Kwong P.D. (2017) How HIV-1 entry mechanism and broadly neutralizing antibodies guide structure-based vaccine design. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 12, 220–240.
- 22. Temin H.M. (1993) A proposal for a new approach to a preventive vaccine against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**(10), 4419–4420.
- 23. Blish C.A., Dogan O.C., Derby N.R., Nguyen M., Chohan B., Richardson B.A., Overbaugh J. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 superinfection oc-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

curs despite relatively robust neutralizing antibody responses. *Virology*. **82**(24), 12094–12103.

- Взоров А.Н., Урываев Л.В. (2017) Критерии для индукции нейтрализующих антител широкого спектра действия против ВИЧ-1 с помощью вакцинации. *Молекуляр. биология*. 51(6), 945–957.
- van Schooten J., van Gils M.J. (2018) HIV-1 immunogens and strategies to drive antibody responses towards neutralization breadth. *Retrovirology*. 15, 74. https://doi.org/10.1186/s12977-018-0457-7
- 26. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P.J., Gilbert A.T., Chang J., Guo Z., Davis C.T., Paulson J.C., Stevens J., Pupprecht C.E., Holmes E.C., Wilson I.A., Donis R.O. (2013) New world bats harbor diverse influenza a viruses. *PLoS Pathog.* 9(10), e1003657.
- 27. Carrat F., Flahault A. (2007) Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. **25**, 6852–6862.
- Soema P.C., Kompier R., Amorij J.P., Kersten G.F. (2015) Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 94, 251–263.
- Wei C.J., Crank M.C., Shiver J., Graham B.S., Mascola J.R., Nabel G.J. (2020) Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 19, 427.
- Sevajol M., Subissi L., Decroly E., Canard B., Imbert I. (2014) Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Res.* 194, 90–99.
- Smith E.C., Blanc H., Surdel M.C., Vignuzzi M., Denison M.R. (2013) Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog.* 9, e1003565.
- 32. Fauver J.R., Petrone M.E., Hodcroft E.B., Shioda K., Ehrlich H.Y., Watts A.G., Vogels C.B.F., Brito A.F., Alpert T., Muyombwe A., Razeq J., Downing R., Cheemarla N.R., Wyllie A.L., Kalinich C.C., Ott I.M., Quick J., Loman N.J., Neugebauer K.M., Greninger A.L., Jerome K.R., Roychoudhury P., Xie H., Shrestha L., Huang M.L., Pitzer V.E., Iwasaki A., Omer S.B., Khan K., Bogoch I.I., Martinello R.A., Foxman E.F., Landry M.L., Neher R.A., Ko A.I., Grubaugh N.D. (2020). Coastto-coast spread of SARS-CoV-2 during the early epidemic in the United States. *Cell.* 181(5), 990–996.e995.
- 33. Bazykin G., Stanevich O., Danilenko D. Fadeev A., Komissarova K., Ivanova A., Sergeeva M., Safina K., Nabieva E., Klink G., Garushyants S., Zabutova J., Kholodnaia A., Skorokhod I., Ryabchikova V.V., Komissarov A., Lioznov D. (2021) Emergence of Y453F and Δ69-70HV mutations in a lymphoma patient with long-term COVID-19. https://virological.org/t/emergence-of-y453f-and-69-70hv-mutations-in-a-lymphomapatient-with-long-term-covid-19/580
- 34. Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Hengartner N., Giorgi E.E., Bhattacharya T., Foley B., Hastie K.M., Parker M.D., Partridge D.G., Evans C.M., Freeman T.M., de Silva T.I., Angyal A., Brown R.L., Carrilero L., Green L.R.,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

Groves D.C., Johnson K.J., Keeley A.J., Lindsey B.B., Parsons P.J., Raza M., Rowland-Jones S., Smith N., Tucker R.M., Wang D., Wyles M.D., McDanal C., Perez L.G., Tang H., Moon-Walker A., Whelan S.P., LaBranche C.C., Saphire E.O., Montefiori D.C. (2020) Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell.* **182**(4), 812–827.e19.

- Li Q., Wu J., Nie J., Zhang L., Hao H., Liu S., Zhao C., Zhang Q., Liu H., Nie L., Qin H., Wang M., Lu Q., Li X., Sun Q., Liu J., Zhang L., Li X., Huang W., Wang Y. (2020) The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell.* 182(5), 1284–1294.e9.
- 36. Rambaut A., Loman N., Pybus O., Barclay W., Barrett J., Carabelli A., Connor T., Peacock T., Robertson D.L., Volz E., on behalf of COVID-19 Genomics Consortium UK (CoG-UK). (2020) Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-inthe-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563
- 37. www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov
- www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/ variant-surveillance/variant-info.html
- 39. To K.K., Hung I.F., Ip J.D., Chu A.W., Chan W.M., Tam A.R., Fong C.H., Yuan S., Tsoi H.W., Ng A.C., Lee L.L., Wan P., Tso E., To W.K., Tsang D., Chan K.H., Huang J.D., Kok K.H., Cheng V.C., Yuen K.Y. (2020) COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 2020 Aug 25, ciaa1275 (Epub ahead of print). https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1275
- 40. Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., Limbo O., Smith C., Song G., Woehl J., Yang L., Abbott R.K., Callaghan S., Garcia E., Hurtado J., Parren M., Peng L., Ricketts J., Ricciardi M.J., Rawlings S.A., Smith D.M., Nemazee D., Teijaro J.R., Voss J.E., Andrabi R., Briney B., Landais E., Sok D., Jardine J.G., Burton D.R. (2020) Rapid isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection in a small animal model. *bioRxiv*. 2020.05.11.088674. https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088674
- 41. Julien J.P., Sok D., Khayat R., Lee J.H., Doores K.J., Walker L.M., Ramos A., Diwanji D.C., Pejchal R., Cupo A., Katpally U., Depetris R.S., Stanfield R.L., McBride R., Marozsan A.J., Paulson J.C., Sanders R.W., Moore J.P., Burton D.R., Poignard P., Ward A.B., Wilson I.A. (2013) Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. *PLoS Pathog.* 9(5), e1003342. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003342
- 42. Pinto D., Park Y.J., Beltramello M., Walls A.C., Tortorici M.A., Bianchi S., Jaconi S., Culap K., Zatta F., De Marco A., Peter A., Guarino B., Spreafico R., Cameroni E., Case J.B., Chen R.E., Havenar-Daughton C., Snell G., Telenti A., Virgin H.W., Lanzavecchia A., Diamond M.S., Fink K., Veesler D., Corti D. (2020) Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human

monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*. **583**(7815), 290–295.

https://doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y

 Piccoli L., Park Y.J., Tortorici M.A., Czudnochowski N., Walls A.C., Beltramello M., Silacci-Fregni C., Pinto D., Rosen L.E., Bowen J.E., Acton O.J., Jaconi S., Guarino B., Minola A., Zatta F., Sprugasci N., Bassi J., Peter A., De Marco A., Nix J.C., Mele F., Jovic S., Rodriguez B.F., Gupta S.V., Jin F., Piumatti G., Lo Presti G., Pellanda A.F., Biggiogero M., Tarkowski M., Pizzuto M.S., Cameroni E., Havenar-Daughton C., Smithey M., Hong D., Lepori V., Albanese E., Ceschi A., Bernasconi E., Elzi L., Ferrari P., Garzoni C., Riva A., Snell G., Sallusto F., Fink K., Virgin H.W., Lanzavecchia A., Corti D., Veesler D. (2020) Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell.* 183(4), 1024–1042.e21.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037

44. Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., Zhang Z., Fan P., Dong Y., Yang Y., Chen Z., Guo Y., Zhang J., Li Y., Song X., Chen Y., Xia L., Fu L., Hou L., Xu J., Yu C., Li J., Zhou Q., Chen W. (2020) A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the spike protein of SARS-CoV-2. *Science*. **369**(6504), 650–655.

https://doi.org/10.1126/science.abc6952

- 45. Yu J., Tostanoski L.H., Peter L., Mercado N.B., Mc-Mahan K., Mahrokhian S.H., Nkolola J.P., Liu J., Li Z., Chandrashekar A., Martinez D.R., Loos C., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Slein M.D., Chen Y., Zuiani A., Lelis F.J.N., Travers M., Habibi S., Pessaint L., Van Ry A., Blade K., Brown R., Cook A., Finneyfrock B., Dodson A., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., He X., Jacob-Dolan C., Kirilova M., Kordana N., Lin Z., Maxfield L.F., Nampanya F., Nityanandam R., Ventura J.D., Wan H., Cai Y., Chen B., Schmidt A.G., Wesemann D.R., Baric R.S., Alter G., Andersen H., Lewis M.G., Barouch D.H. (2020) DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*. 369(6505), 806–811. https://doi.org/10.1126/science.abc6284
- 46. McLellan J.S., Chen M., Leung S., Graepel K.W., Du X., Yang Y., Zhou T., Baxa U., Yasuda E., Beaumont T., Kumar A., Modjarrad K., Zheng Z., Zhao M., Xia N., Kwong P.D., Graham B.S. (2013) Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science*. **340**(6136), 1113–1117. https://doi.org/10.1126/science.1234914
- Vzorov A.N., Lea-Fox D., Compans R.W. (1999) Immunogenicity of full length and truncated SIV envelope proteins. *Viral. Immunol.* 12, 205–215.
- Tong T., Crooks E.T., Osawa K., Binley J.M. (2012) HIV-1 virus-like particles bearing pure env trimers expose neutralizing epitopes but occlude nonneutralizing epitopes. *J. Virol.* 86, 3574–3587.
- Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*. 240, 1759–1764.
- 50. Vzorov A.N., Compans R.W. (2011) Effects of stabilization of the gp41 cytoplasmic domain on fusion activity

and infectivity of SIVmac239. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 27, 1213–1222.

- Взоров А.Н., Компанс Р.В. (2016) Вакцины против ВИЧ на основе вирусоподобных частиц и влияние модификаций в белке Env на их антигенные свойства. *Молекуляр. биология.* 50(3), 406–415.
- Vzorov A.N., Wang L., Wang B.Z., Compans R.W. (2016) Effects of modification of the HIV-1 Env cytoplasmic tail on immunogenicity of VLP vaccines. *Virology*. 489, 141–150.
- Weldon W.C., Wang B.Z., Martin M.P., Koutsonanos D.G., Skountzou I., Compans R.W. (2010) Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin. *PLoS One.* 5(9), e12466. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012466
- 54. Tang T., Bidon M., Jaimes J.A., Whittaker G.R., Daniel S. (2020) Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res.* **178**, 104792.
- 55. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. **367**(6483), 1260– 1263.

https://doi.org/10.1126/science.abb2507

- Rey F.A., Lok S.M. (2018) Common features of enveloped viruses and implications for immunogen design for next-generation vaccines. *Cell.* **172**, 1319–1334. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.054
- 57. Pallesen J., Wang N., Corbett K.S., Wrapp D., Kirchdoerfer R.N., Turner H.L., Cottrell C.A., Becker M.M., Wang L., Shi W., Kong W.P., Andres E.L., Kettenbach A.N., Denison M.R., Chappell J.D., Graham B.S., Ward A.B., McLellan J.S. (2017) Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**(35), E7348–E7357.

https://doi.org/10.1073/pnas.1707304114

- Xie X., Liu Y., Liu J., Zhang X., Zou J., Fontes-Garfias C.R., Xia H., Swanson K.A., Cutler M., Cooper D., Menachery V.D., Weaver S.C., Dormitzer P.R., Shi P.Y. (2021) Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K and N501Y variants by BNT162b2 vaccine-elicited sera. *Nat. Med.* 27, 620–621. https://doi.org/10.1038/s41591-021-01270-433558724
- Wibmer C.K., Ayres F., Hermanus T., Madzivhandila M., Kgagudi P., Oosthuysen B., Lambson B.E., de Oliveira T., Vermeulen M., van der Berg K., Rossouw T., Boswell M., Ueckermann V., Meiring S., von Gottberg A., Cohen C., Morris L., Bhiman J.N., Moore P.L. (2021) SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat. Med.* 27, 622–625.

https://doi.org/10.1038/s41591-021-01285-x

- DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines 12 November 2020 WHO. https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidatevaccines
- Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S, Kovyrshina A.V., Bo-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

tikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A, Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. (2020) Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* **396**(10255), 887–897. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3

- 62. Corbett K.S., Flynn B., Foulds K.E., Francica J.R., Boyoglu-Barnum S., Werner A.P., Flach B., O'Connell S., Bock K.W., Minai M., Nagata B.M., Andersen H., Martinez D.R., Noe A.T., Douek N., Donaldson M.M., Nji N.N., Alvarado G.S., Edwards D.K., Flebbe D.R., Lamb E., Doria-Rose N.A., Lin B.C., Louder M.K., O'Dell S., Schmidt S.D., Phung E., Chang L.A., Yap C., Todd J.M., Pessaint L., Van Ry A., Browne S., Greenhouse J., Putman-Taylor T., Strasbaugh A., Campbell T.A., Cook A., Dodson A., Steingrebe K., Shi W., Zhang Y., Abiona O.M., Wang L., Pegu A., Yang E.S., Leung K., Zhou T., Teng I.T., Widge A., Gordon I., Novik L., Gillespie R.A., Loomis R.J., Moliva J.I., Stewart-Jones G., Himansu S., Kong W.P., Nason M.C., Morabito K.M., Ruckwardt T.J., Ledgerwood J.E., Gaudinski M.R., Kwong P.D., Mascola J.R., Carfi A., Lewis M.G., Baric R.S., McDermott A., Moore I.N., Sullivan N.J., Roederer M., Seder R.A., Graham B.S. (2020) Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates. N. Engl. J. Med. 383(16), 1544-1555. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024671
- Mulligan M.J., Lyke K.E., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Neuzil K., Raabe V., Bailey R., Swanson K.A., Li P., Koury K., Kalina W., Cooper D., Fontes-Garfias C., Shi P.Y., Türeci Ö., Tompkins K.R., Walsh E.E., Frenck R., Falsey A.R., Dormitzer P.R., Gruber W.C., Şahin U., Jansen K.U. (2020) Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*. 586(7830), 589–593. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2639-4
- 64. Folegatti P.M., Ewer K.J., Aley P.K., Angus B., Becker S., Belij-Rammerstorfer S., Bellamy D., Bibi S., Bittaye M., Clutterbuck EA., Dold C., Faust S.N., Finn A., Flaxman A.L., Hallis B., Heath P., Jenkin D., Lazarus R., Makinson R., Minassian A.M., Pollock K.M., Ramasamy M., Robinson H., Snape M., Tarrant R., Voysey M., Green C., Douglas AD., Hill A.V.S., Lambe T., Gilbert S.C., Pollard A.J., Aboagye J., Adams K., Ali A., Allen E., Allison J.L., Anslow R., Arbe-Barnes E.H., Babbage G., Baillie K., Baker M., Baker N., Baker P., Baleanu I., Ballaminut J., Barnes E., Barrett J., Bates L., Batten A., Beadon K., Beckley R., Berrie E., Berry L., Beveridge A., Bewley K.R., Bijker E.M., Bingham T., Blackwell L., Blundell CL., Bolam E., Boland E., Borthwick N., Bower T., Boyd A., Brenner T., Bright P.D., Brown-O'Sullivan C., Brunt E., Burbage J., Burge S., Buttigieg K.R., Byard N., Cabera Puig I., Calvert A., Camara S., Cao M., Cappuccini F., Carr M., Carroll MW., Carter V., Cathie K., Challis R.J., Charlton S., Chelysheva I., Cho J.-S., Cicconi P., Cifuentes L., Clark H.,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

Clark E., Cole T., Colin-Jones R., Conlon C.P., Cook A., Coombes N.S., Cooper R., Cosgrove C.A., Coy K., Crocker W.E.M., Cunningham C.J., Damratoski B.E., Dando L., Datoo M.S., Davies H., De Graaf H., Demissie T., Di Maso C., Dietrich I., Dong T., Donnellan F.R., Douglas N., Downing C., Drake J., Drake-Brockman R., Drury R.E., Dunachie S.J., Edwards N.J., Edwards F.D.L., Edwards C.J., Elias S.C., Elmore M.J., Emary K.R.W., English M.R., Fagerbrink S., Felle S., Feng S., Field S., Fixmer C., Fletcher C., Ford KJ., Fowler J., Fox P., Francis E., Frater J., Furze J., Fuskova M., Galiza E., Gbesemete D., Gilbride C., Godwin K., Gorini G., Goulston L., Grabau C., Gracie L., Gray Z., Guthrie L.B., Hackett M., Halwe S., Hamilton E., Hamlyn J., Hanumunthadu B., Harding I., Harris S.A., Harris A., Harrison D., Harrison C., Hart T.C., Haskell L., Hawkins S., Head I., Henry J.A., Hill J., Hodgson S.H.C., Hou M.M., Howe E., Howell N., Hutlin C., Ikram S., Isitt C., Iveson P., Jackson S., Jackson F., James S.W., Jenkins M., Jones E., Jones K., Jones C.E., Jones B., Kailath R., Karampatsas K., Keen J., Kelly S., Kelly D., Kerr D., Kerridge S., Khan L., Khan U., Killen A., Kinch J., King T.B., King L., King J., Kingham-Page L., Klenerman P., Knapper F., Knight J.C., Knott D., Koleva S., Kupke A., Larkworthy C.W., Larwood J.P.J., Laskey A., Lawrie A.M., Lee A., Ngan Lee K.Y., Lees E.A., Legge H., Lelliott A., Lemm N.-M., Lias A.M., Linder A., Lipworth S., Liu X., Liu S., Lopez Ramon R., Lwin M., Mabesa F., Madhavan M., Mallett G., Mansatta K., Marcal I., Marinou S., Marlow E., Marshall J.L., Martin J., McEwan J., McInroy L., Meddaugh G., Mentzer A.J., Mirtorabi N., Moore M., Moran E., Morey E., Morgan V., Morris S.J., Morrison H., Morshead G., Morter R., Mujadidi Y.F., Muller J., Munera-Huertas T., Munro C., Munro A., Murphy S., Munster VJ., Mweu P., Noé A., Nugent F.L., Nuthall E., O'Brien K., O'Connor D., Oguti B., Oliver JL., Oliveira C., O'Reilly P.J., Osborn M., Osborne P., Owen C., Owens D., Owino N., Pacurar M., Parker K., Parracho H., Patrick-Smith M., Payne V., Pearce J., Peng Y., Peralta Alvarez M.P., Perring J., Pfafferott K., Pipini D., Plested E., Pluess-Hall H., Pollock K., Poulton I., Presland L., Provstgaard-Morys S., Pulido D., Radia K., Ramos Lopez F., Rand J., Ratcliffe H., Rawlinson T., Rhead S., Riddell A., Ritchie A.J., Roberts H., Robson J., Roche S., Rohde C., Rollier C.S., Romani R., Rudiansyah I., Saich S., Sajjad S., Salvador S., Sanchez Riera L., Sanders H., Sanders K., Sapaun S., Sayce C., Schofield E., Screaton G., Selby B., Semple C., Sharpe H.R., Shaik I., Shea A., Shelton H., Silk S., Silva-Reyes L., Skelly DT., Smee H., Smith C.C., Smith D.J., Song R., Spencer A.J., Stafford E., Steele A., Stefanova E., Stockdale L., Szigeti A., Tahiri-Alaoui A., Tait M., Talbot H., Tanner R., Taylor IJ., Taylor V., Te Water Naude R., Thakur N., Themistocleous Y., Themistocleous A., Thomas M., Thomas T.M., Thompson A., Thomson-Hill S., Tomlins J., Tonks S., Towner J., Tran N., Tree J.A., Truby A., Turkentine K., Turner C., Turner N., Turner S., Tuthill T., Ulaszewska M., Varughese R., Van Doremalen N., Veighey K., Verheul M.K., Vichos I., Vitale E., Walker L., Watson M.E.E., Welham B., Wheat J., White C., White R., Worth A.T., Wright D., Wright S., Yao X.L., Yau Y. (2020) Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomized controlled trial. *Lancet.* **396**, 467–478.

- 65. Amanat F., Strohmeier S., Rathnasinghe R., Schotsaert M., Coughlan L., García-Sastre A., Krammer F. (2020) Introduction of two prolines and removal of the polybasic cleavage site leads to optimal efficacy of a recombinant spike based SARS-CoV-2 vaccine in the mouse model. *bioRxiv*. 2020.09.16.300970. https://doi.org/10.1101/2020.09.16.300970
- 66. Keech C., Albert G., Cho I., Robertson A., Reed P., Neal S., Plested J.S., Zhu M., Cloney-Clark S., Zhou H., Smith G., Patel N., Frieman M.B., Haupt R.E., Logue J., McGrath M., Weston S., Piedra P.A., Desai C., Callahan K., Lewis M., Price-Abbott P., Formica N., Shinde V., Fries L., Lickliter J.D., Griffin P., Wilkinson B., Glenn G.M. (2020) Phase 1–2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N. Engl. J. Med.* 383(24), 2320–2332. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2026920

67. Mercado N.B., Zahn R., Wegmann F., Loos C., Chandrashekar A., Yu J., Liu J., Peter L., McMahan K., Tostanoski L.H., He X., Martinez D.R., Rutten L., Bos R., van Manen D., Vellinga J., Custers J., Langedijk J.P., Kwaks T., Bakkers M.J.G., Zujidgeest D., Rosendahl Huber S.K., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Feldman J., Hauser B.M., Caradonna T.M., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Hoffman E., Jacob-Dolan C., Kirilova M., Li Z., Lin Z., Mahrokhian S.H., Maxfield L.F., Nampanya F., Nityanandam R., Nkolola J.P., Patel S., Ventura J.D., Verrington K., Wan H., Pessaint L., Van Ry A., Blade K., Strasbaugh A., Cabus M., Brown R., Cook A., Zouantchangadou S., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Cai Y., Chen B., Schmidt A.G., Reeves R.K., Baric R.S., Lauffenburger D.A., Alter G., Stoffels P., Mammen M., Van Hoof J., Schuitemaker H., Barouch D.H. (2020) Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. Nature. **586**(7830), 583-588.

https://doi.org/10.1038/s41586-020-2607-z

- Laczkó D., Hogan M.J., Toulmin S.A., Hicks P., Lederer K., Gaudette B.T., Castaño D., Amanat F., Muramatsu H., Oguin T.H. 3rd, Ojha A., Zhang L., Mu Z., Parks R., Manzoni T.B., Roper B., Strohmeier S., Tombácz I., Arwood L., Nachbagauer R., Karikó K., Greenhouse J., Pessaint L., Porto M., Putman-Taylor T., Strasbaugh A., Campbell T.A., Lin P.J.C., Tam Y.K., Sempowski G.D., Farzan M., Choe H., Saunders K.O., Haynes B.F., Andersen H., Eisenlohr L.C., Weissman D., Krammer F., Bates P., Allman D., Locci M., Pardi N. (2020) A single immunization with nucleoside-modified mRNA vaccines elicits strong cellular and humoral immune responses against SARS-CoV-2 in mice. *Immunity*. 53(4), 724–732.e7. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.019
- 69. Zhu F.C., Guan X.H., Li Y.H., Huang J.Y., Jiang T., Hou L.H., Li J.X., Yang B.F., Wang L., Wang W.J., Wu S.P., Wang Z., Wu X.H., Xu J.J., Zhang Z., Jia S.Y., Wang B.S., Hu Y., Liu J.J., Zhang J., Qian X.A., Li Q., Pan H.X., Jiang H.D., Deng P., Gou J.B., Wang X.W., Wang X.H., Chen W. (2020) Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial.

*Lancet.* **396**(10249), 479–488. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6

- Robert-Guroff M. (2007). Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 546–556.
- Pied N., Wodrich H. (2019) Imaging the adenovirus infection cycle. *FEBS Lett.* **593**(24), 3419–3448. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13690
- 72. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskava T.A., Esmagambetov I.B., Favorskava I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskava E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L.; Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group (2021) Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous primeboost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. Lancet. 397(10275), 671-681. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8
- Ledford H. (2021) Why COVID vaccines are so difficult to compare. *Nature*. **591**, 16–17. https://www.nature. com/articles/d41586-021-00409-0
- Iwasaki A., Yang Y. (2020) The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 339–341.
- Nechipurenko Y.D., Anashkina A.A., Matveeva O.V. (2020) Change of antigenic determinants of SARS-CoV-2 virus S-protein as a possible cause of antibodydependent enhancement of virus infection and cytokine storm. *Biophysics* (Oxf.) 65, 703–709. https://doi.org/10.1134/S0006350920040119
- 76. Зайчук Т.А., Нечипуренко Ю.Д., Аджубей А.А., Оникиенко С.Б., Черешнев В.А., Зайнутдинов С.С., Кочнева Г.В., Нетесов С.В., Матвеева О.В. (2020) Проблемы создания вакцин против бетакоронавирусов: антителозависимое усиление инфекции и вирус Сендай как возможный вакцинный вектор. *Молекуляр. биология.* 54(6), 922–938. https://doi.org/10.31857/S0026898420060154
- 77. Xu J., Zhao S., Teng T., Abdalla A.E., Zhu W., Xie L., Wang Y., Guo X. (2020) Systematic comparison of two animal-to-human transmitted human coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses.* 12(2), 244. https://doi.org/10.3390/v12020244
- Roncati L., Palmieri B. (2020) What about the original antigenic sin of the humans versus SARS-CoV-2? *Med. Hypotheses.* 142, 109824. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109824
- Kim J.H., Skountzou I., Compans R., Jacob J. (2009) Original antigenic sin responses to influenza viruses. *J. Immunol.* 183, 3294–3301.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

## MODIFICATION OF THE SPIKE PROTEIN FOR VACCINES AGAINST ENVELOPED RNA VIRUSES

A. N. Vzorov<sup>1, 2, \*</sup>, E. I. Samokhvalov<sup>1</sup>, V. V. Chebanenko<sup>2</sup>, D. V. Scheblyakov<sup>1</sup>, and A. L. Gintsburg<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

<sup>2</sup>Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia <sup>3</sup>Department of Viral Infection, Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

\*e-mail: anvzorov@mail.ru

Most vaccines work by inducing neutralizing antibodies that target the viral envelope. Enveloped RNA viruses have evolved mechanisms for surface glycoproteins to evade host immune responses, which exhibit substantial variability, even among different strains. Natural infection and vaccines using native forms of surface proteins may induce broadly neutralizing antibodies, yet with low and ineffective levels. Class I membranefusion proteins of enveloped RNA viruses, HIV-1, influenza A virus, SARS-CoV-2, yield a stable conformation (so-called "pre-fusion") in providing fusion between viral and host cell membranes. Modified viral surface proteins that are based on these features induce neutralizing antibodies with activity available against a broad spectrum of circulating strains and make it possible to overcome the difficulties associated with escape/variability of viral antigen.

**Keywords:** enveloped RNA viruses, SARS-CoV-2, HIV-1, influenza A virus, spike protein, hemagglutinin, Env, fusion, immunogen, neutralizing antibodies, vaccines

### ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575:599.9

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВЫХ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК С ОНКОГЕННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ

# © 2021 г. О. И. Бровкина<sup>*a*, *b*, *#*, *\**, И. В. Пронина<sup>*a*, *#*</sup>, Л. А. Урошлев<sup>*a*, *c*</sup>, М. В. Фридман<sup>*c*</sup>, В. И. Логинов<sup>*a*</sup>, Т. П. Казубская<sup>*d*</sup>, Д. О. Уткин<sup>*d*</sup>, Н. Е. Кушлинский<sup>*d*</sup>, Э. А. Брага<sup>*a*</sup></sup>

<sup>а</sup>Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

<sup>b</sup>Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 115682 Россия

<sup>с</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 117971 Россия

<sup>d</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина

Министерства здравоохранения России, Москва, 115478 Россия

\**e-mail: brov.olia@gmail.com* Поступила в редакцию 17.11.2020 г. После доработки 05.12.2020 г. Принята к публикации 07.12.2020 г.

В последнее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о роли длинных некодирующих РНК (IncPHK) как важнейшего регулятора транскрипции в клетках. С помощью метода глубинного машинного обучения определены четыре новых IncPHK, дифференциально экспрессирующихся в опухолях яичников: TMEM92-AS1, FAM222A-AS, TXLNB и Inc-CCL28. Представленность транскриптов Inc-CCL28 была достаточной, как в опухолях, так и в нормальной ткани, для дальнейшего анализа методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). На основании литературных данных, а также предыдущих исследований нашей лаборатории, помимо Inc-CCL28 для ОТ-ПЦР анализа были выбраны также IncPHK LINC00152, NEAT1 и SNHG17 как наиболее перспективные потенциальные маркеры для диагностики и прогноза рака яичников. Впервые в опухолях яичников обнаружено повышение уровня Inc-CCL28 и SNHG17 и подтверждена гиперэкспрессия LINC00152 и NEAT1. Для Inc-CCL28 впервые показана вовлеченность не только в патогенез яичников, но и в канцерогенез в целом. Выявлено, что гиперэкспрессия LINC00152 и Inc-CCL28 статистически значимо ассоциирована с более поздними стадиями и метастазированием. Таким образом, идентифицированы новые IncPHK, дифференциально экспрессирующиеся в опухолях яичников, а также обнаружены IncPHK с онкогенным и прогностическим потенциалом.

**Ключевые слова:** длинные некодирующие РНК, глубинное машинное обучение, дифференциальная экспрессия, онкогенный потенциал, прогностический маркер, lnc-CCL28 **DOI:** 10.31857/S0026898421030034

В последнее время накапливается все больше данных, свидетельствующих о роли длинных некодирующих РНК (lncPHK) в регуляции биологических процессов в клетке, а также в качестве потенциального биомаркера в онкологии [1]. Размер lncPHK составляет не менее 200 п.о., и на них не происходит трансляции белка. Долгое время считалось, что lncPHK не несет биологической функции. Позже обнаружили, что транскрипционная активность генов lncPHK иногда достигает высоких уровней и lncPHK может связываться с гистонами и транскрипционными факторами [2, 3]. В дальнейшем показали, что lncPHK – важнейший регулятор транскрипции в клетках [4–6]. Эти результаты стимулировали исследования по выяснению роли lncPHK в развитии злокачественных опухолей, в том числе рака яичников (PЯ). Следует заметить, что для РЯ вопрос поиска биомаркеров до сих пор стоит очень остро. РЯ лидирует среди онкологических заболеваний по смертности среди женщин. Ранняя диагностика и подобранная с учетом генетических и внешних факторов терапия позволяют существенно минимизировать риски осложнений и летального исхода. Одним из наиболее вероятных механизмов нарушения уровня lncPHK при РЯ считается дисбаланс тройной связи: lncPHK-микроPHK-мPHK. Чаще всего lncPHK комплементарно связывается с

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup> Эти авторы внесли равный вклад.

микроРНК (miPHK), что сопровождается повышением уровня соответствующей мРНК в клетке [7].

Появление новых высокопроизводительных методов транскриптомного анализа привело к накоплению больших массивов данных, которые представлены в открытых репозиториях. Анализ таких данных позволяет выявить новые перспективные lncPHK и сравнить их специфичность с уже найденными lncPHK и miPHK. Именно такой подход использован нами для решения одной из задач представленной работы — скрининга lncPHK, предположительно связанных с miPHK, вовлеченных в патогенез РЯ [8]. Работу проводили с применением доступных баз данных и математического моделирования.

Второй задачей исследования был анализ экспрессии lncPHK, найденных по результатам скрининга и в опубликованных работах, на выборке опухолей и парной гистологически неизмененной ткани яичников больных РЯ. На основании данных литературы мы выбрали LINC00152, NEAT1, SNHG17 — lncPHK, способные (по данным базы PathCards, https://pathcards.genecards.org/) к связыванию тех супрессорных miPHK, роль которых в развитии и прогрессии РЯ установлена нами ранее (например, miR-124 и miR-125b) [8].

Выбранные нами lncPHK считаются онкогенными и отличаются повышенным уровнем экспрессии в образцах опухолей разной локализации. Так, повышенная экспрессия LINC00152 характерна для многих типов рака, таких как гепатоцеллюлярная карцинома, светлоклеточная почечно-клеточная карцинома, рак желудка, рак желчного пузыря, а также обнаружена в опухолях больных РЯ [9–12]. Гиперэкспрессия LINC00152 ассоциирована с ростом злокачественных новообразований, что может быть объяснено тем, что эта lncPHK регулирует экспрессию гена *MCL1*, кодирующего антиапоптотический белок MCL-1 [13].

NEAT1 — одна из наиболее представленных lncPHK в опухолевых клетках, согласно последним работам, включающим транскриптомный анализ методом RNA-Seq [14, 15]. Дисрегуляция гена *NEAT1* приводит к гиперэкспрессии Hu-антигена, который индуцирует воспаление и действует как антиапоптотический фактор [16].

В отличие от указанных выше lncPHK, роль SNHG17 в развитии РЯ еще не установлена, хотя была показана связь гиперэкспрессии SNHG17 с ростом опухоли и эпителиально-мезенхимальным переходом у больных раком молочной железы [17].

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформатический анализ баз данных. Для скрининга генов lncPHK со статистически значимой дифференциальной экспрессией проанализированы базы данных GEO (Gene Expression Omnibus; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds) и TCGA (The Cancer Genome Atlas; https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tc-ga). Из первой базы собрана информация по 50 образцам РЯ, для которых выполнено секвенирование lncPHK. Из второй базы данных собрана информация по 500 образцам РЯ (из 739, имеющихся в базе), для которых выполнено секвенирование lncPHK.

Для образцов из базы данных GEO проведена нормализация. С помощью процедуры remove-BatchEffect из пакета limma в R-studio [18] выполнено устранение систематических ошибок, возникающих на этапе выравнивания последовательностей.

С целью разбить полученную совокупность lncPHK на отдельные кластеры использованы алгоритмы метода главных компонент (principal component analysis; PCA) [19] и метод визуализации данных высокой размерности с помощью представления каждой точки данных в двух- или трехмерном пространстве (стохастическое вложение соседей с *t*-распределением, *t*-distributed stochastic neighbor embedding; t-SNE) [20]. Далее lncPHK отбирали по дифференциальной экспрессии со значением *p*-параметра < 0.05 с поправкой на множественные данные.

Для выявления взаимосвязи между lncPHK и miPHK применена модель математического обучения, основанная на технике классификации и регрессии в форме ансамбля слабых предсказывающих моделей – обычно деревьев решений [21].

Клинико-морфологические данные. Образцы опухолей и парной гистологически не измененной ткани яичников больных РЯ были собраны и морфологически охарактеризованы в ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России. Исследование было инициировано после одобрения Комиссии по этике и получения Информированного согласия на добровольное участие. Использованы образцы, полученные от 35 больных РЯ; клинико-морфологические данные приведены в табл. 1.

Пациенты до операции не получали ни химиотерапевтического, ни лучевого лечения. Все образцы были классифицированы в соответствии с ТNM-классификацией [22] и гистологически верифицированы на основании критериев классификации ВОЗ [23]. Образцы тканей хранили при -70°С. Полученные в ходе биопсии или оперативного вмешательства образцы объемом до 5 мм<sup>3</sup> измельчали с использованием гомогенизатора Т 10 basic Ultra-Turrax ("IKA", Германия).

**Выделение РНК.** Тотальную РНК выделяли с использованием протокола гуанидин-тиоцианатфенол-хлороформной экстракции [24]. Концентрацию суммарной РНК определяли спектрофо-

Клинико-морфологические па	Число, %	
	<40	5 (14)
Возраст пациентов, лет	40-60	17 (49)
	>60	13 (37)
	Ι	8 (22)
	II	5 (14)
Стадия заболевания	III	20 (59)
	IV	2 (5)
	T1	8 (23)
Размер первичной опухоли	T2	6 (17)
	T3	21 (60)
	Nx	5 (14)
Лимфогенное метастазирование	N0	20 (57)
	N1	10 (29)
He average and	есть	29 (83)
паличие метастазов"	нет	6 (17)

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с РЯ и взятых у них образцов опухолей

<sup>а</sup> Учтены лимфатические, отдаленные и перитонеальные метастазы.

тометрически при длине волны 260 нм. Качество РНК также оценивали спектрофотометрически с использованием коэффициентов поглощения при 260 против 230 нм и 260 против 280 нм. Сохранность РНК определяли по соотношению интенсивностей полос 28S рРНК и 18S рРНК при электрофорезе в 1%-ном денатурирующем агарозном геле. Перед использованием все образцы РНК обрабатывали ДНКазой, свободной от РНКазы. Концентрацию суммарной РНК в водном растворе оценивали на спектрофотометре NanoVue Plus ("GE Healthcare", Великобритания). Анализ экспрессии lncPHK. Для обратной транскрипцию (OT) PHK использовали обратную транскриптазу MMLV ("Евроген", Россия) с добавлением случайных гексануклеотидных праймеров. При каждой постановке реакции ОТ включали отрицательные контроли, не содержащие PHK.

ПЦР в реальном времени проводили в 96-луночном планшете в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green, – qPCRmix-HS SYBR ("Евроген"). В табл. 2 представлены праймеры, использованные в ОТ-ПЦР.

Условия амплификации фрагментов ДНК: 1 мин при 95°С (1 цикл); 20 с при 95°С, 20 с при 62°С (40 циклов). Для оценки экспрессии целевых генов в качестве контроля использовали экспрессию гена *B2M*, в качестве нормы — парные непораженные ткани. Для ПЦР в реальном времени использовали термоциклер СFX96 ("Віо-Rad", США). ПЦР в реальном времени проводили в трех повторах. Наличие и длину продукта анализировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с интеркалирующим красителем бромидом этидия.

Статистическая обработка результатов. График амплификации обрабатывали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager v3.1. Применен  $\Delta\Delta$ CT-метод для относительного количественного анализа с учетом образцов сравнения (парных непораженных тканей). Данные всех экспериментов были объединены в одно исследование с помощью пакета программ Bio-Rad CFX Manager v3.1. Непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни для определения различий между двумя группами рассчитан с помощью программы R-Studio.

Таблица 2. Исследованные методом ОТ-ПЦР IncPHK и праймеры для их анализа

lncPHK	Длина ампликона, п.н.	Последовательности праймеров <sup>а</sup> , 5' $\rightarrow$ 3'
NEAT1	119	CCATCCTGGTGTGCCATATT
	110	GCCAACACTCTCTGGCTATAC
LINC00152	07	GAAGGCTGTGTGCCTCTATT
	97	TCAGGTTGGTGCTATTGGTATC
SNHG17	107	GGGATCTGGGTTTGCTGATATT
	107	GTAGCCTCACTCTCCATTCTCT
Inc-CCL28	85	TGGACTTGACCACATGACTAAC
	83	CAAGCACCACTGCACAAATAC

<sup>а</sup> Праймеры подбирали в программе Beacon Designer ("Premier Biosoft International", США).


**Рис. 1.** Кластеризация lncPHK методом главных компонент. Знаками "минус" обозначены miPHK, знаками "плюс" – lncPHK. Синим цветом выделены кластеры miPHK, красным – lncPHK. По осям X и Y находятся значения, соответственно первой и второй главной компоненты в методе PCA.

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Результаты скрининга IncPHK, выбранных на основании анализа баз данных

Методом снижения размерности t-SNE выделено несколько кластеров, содержащих lncPHK, и несколько кластеров, содержащих miPHK (рис. 1).

С помощью анализа кластеров, полученных в результате построения математической модели методом глубинного машинного обучения, удалось выявить четыре lncPHK со статистически значимой дифференциальной экспрессией (табл. 3).

Таким образом, биоинформатически отобраны lncPHK, потенциально способные к взаимодействию с miPHK (miR-34b, miR-339, miR-148a и miR-375), которые, как нами показано ранее [8, 9], вовлечены в патогенез РЯ.

# Анализ экспрессии IncPHK методом ОТ-ПЦР

Из четырех дифференциально экспрессирующихся lncPHK, отобранных при биоинформатическом скрининге баз данных, для дальнейшего исследования методом ОТ-ПЦР выбрана lnc-CCL28 (табл. 2), представленность которой была достаточной для определения методом ОТ-ПЦР как в опухолях, так и в нормальной ткани. В результате анализа баз данных выявлена отрицательная корреляция между уровнями lnc-CCL28 и miR-148a-3p ( $r_s = -0.30, p = 0.1, табл. 3$ ), что указывает на возможность прямого или опосредованного взаимодействия lnc-CCL28 с miR-148a-3p в опухолях яичников. Ранее нами показано, что miPHK miR-148a-3p вовлечена в патогенез РЯ [8].

С помощью биоинформатического скрининга и данных литературы отобрано четыре lncPHK: lnc-CCL28, LINC00152, NEAT1 и SNHG17. Все



**Рис. 2.** Экспрессия Inc-CCL28, LINC00152, NEAT1 и SNHG17 в образцах опухолей РЯ и в нормальной ткани. По оси ординат приведены средние значения уровней исследованных IncPHK в нормальных и опухолевых образцах по отношению к экспрессии гена B2M. Вверху приведены значения p, полученные по результатам теста Манна–Уитни.

они связываются с miPHK, роль которых в развитии и прогрессии РЯ установлена нами ранее (miR-148a, miR-124, miR-125b) [8, 9]. Методом ОТ-ПЦР мы проанализировали экспрессию этих четырех lncPHK и выявили статистически значимые различия в образцах опухолей и нормальной ткани (рис. 2). Анализ результатов ОТ-ПЦР выполнен с применением пакета программ Bio-Rad CFX Manager v3.1. и программы R-Studio.

Таким образом, методом ОТ-ПЦР зарегистрирована гиперэкспрессия четырех lncPHK: lnc-CCL28, LINC00152, NEAT1 и SNHG17 — в образцах опухолей РЯ, из чего можно предполагать их участие в онкогенезе. Следует подчеркнуть, что повышение экспрессии lnc-CCL28 и SNHG17 обнаружено при РЯ впервые, а о дифференциальной экспрессии lnc-CCL28 ранее вообще не сообщалось.

Установлено, что экспрессия lnc-CCL28 и LINC00152 значимо выше в опухолях, размер которых более 5 см (табл. 4). Кроме того, для этих двух lncPHK обнаружено значимое повышение экспрессии на более поздних, III и IV, стадиях в сравнении с I и II стадиями заболевания (табл. 4). Впервые выявлена значимая связь гиперэкспрессии lnc-CCL28 и LINC00152 с наличием метастазов у пациентов (табл. 4).

Экспрессия NEAT1 и SNHG17 была значимо повышена у пациентов с размером опухоли более 5 см, однако не выявлена зависимость экспрессии этих lncPHK от стадии и наличия метастазов (табл. 4).

Полученные нами результаты для LINC00152, NEAT1 и SNHG17 согласуются с данными других авторов по экспрессии генов этих lncPHK в опухолях разных локализаций [11, 17, 25]. Заметим, что для SNHG17 впервые выявлена потенциально онкогенная роль при PЯ, а для lnc-CCL28 — при канцерогенезе вообще.

Кроме того, нами обнаружено, что повышенная экспрессия lnc-CCL28 и LINC00152 ассоциирована с неблагоприятным прогнозом при РЯ. В случае LINC00152 это может быть связано с тем, что эта lncPHK негативно регулирует уровень miR-125b (табл. 5). Эта miPHK, в свою очередь, контролирует экспрессию гена миелоидноклеточного лейкоза-1, *MCL1*, стимулирующего клеточный рост и пролиферацию [26]. Таким образом, высокая экспрессия LINC00152 может активировать транскрипцию гена *MCL1* за счет тройной связи: lncPHK-miPHK-мPHK – и тем самым выполнять роль конкурентной эндогенной PHK.

Биологическая роль Inc-CCL28 пока остается неясной, однако информация в базах данных miRBase (http://www.mirbase.org/) и DIANA (http://diana. imis.athena-innovation.gr/) свидетельствует о том, что эта IncPHK ингибирует экспрессию miR-27b-3p за счет комплементарного спаривания оснований

Таблица 3. Дифференциально экспрессирующиеся lncPHK и корреляция с экспрессией miPHK, потенциально связанных с патогенезом РЯ

lncPHK	Доля образцов с экспрессией в опухоли (слева) и в норме (справа) <sup>а</sup>	log <sub>2</sub> FC <sup>b</sup>	<i>p</i> -value	miPHK <sup>c</sup>	Корреляция <sup>d</sup> , <i>r<sub>s</sub>/p</i> -value
TMEM92-AS1	730/758, 23/58	13.1	0.001	miR-34b-3p	-0.80/0.01
FAM222A-AS	736/758, 18/58	14.1	0.001	miR-339-3p	-0.91/0.02
Inc-CCL28	752/758, 3/58	17.5	0.001	miR-148a-3p	-0.30/0.10
TXLNB	692/758, 0/58	>10 <sup>5</sup>	< 0.001	miR-375	-0.34/0.30

<sup>а</sup>Исследованы комбинации образцов из баз GEO и TCGA. <sup>b</sup>Логарифмированное отношение нормированной экспрессии в опухолевых и нормальных образцах. <sup>c</sup>miPHK, потенциально взаимодействующие с lncPHK. <sup>d</sup>Koppeляция между уровнями lncPHK и miPHK: *r*<sub>s</sub> – коэффициент корреляции Спирмена.

IncPHK	<i>p</i> -value (CI 95) <sup>a</sup>			
morring	размер опухоли T1/T2-3	стадии I–II/III–IV	метастазы +/-	
Inc-CCL28	0.07 (-11.1-5.1)	0.04 (-14.4-7.9)	0.02 (-32.2-10.4)	
LINC00152	0.02 (-1.3-0.4)	0.03 (-1.7-0.6)	0.02 (-3.9-1.3)	
NEAT1	0.05 (-26.2-33.6)	0.90 (-16.2-27.0)	0.61 (-33.1-25.6)	
SNHG17	0.05 (-20.2-49.2)	0.08 (-19.7-29.1)	0.63 (-19.8-9.4)	

Таблица 4. Корреляция уровней экспрессии lnc-CCL28, LINC00152, NEAT1 и SNHG17 с клинико-морфологической характеристикой образцов опухолей больных РЯ

<sup>а</sup>Сравнение средних значений экспрессии для определения различий между двумя группами с помощью критерия Манна— Уитни. В скобках указаны значения доверительного интервала с вероятностью 95%.

Таблица 5.	Характеристика и	сследованных lncPHK <sup>a</sup>
------------	------------------	----------------------------------

lncPHK	Локализация	Биологическая роль	Связь с тіРНК	Белковая мишень
lnc-CCL28	Не установлена	Не установлена	miR-455-3p miR-27b-3p miR-148a-3p	Не установлена
LINC00152	Внеклеточная, цито- плазма, цитоскелет	Способствует делению клеток и росту метастазов	miR-139-5p miR-125b	MCL-1 PI3K/AKT
NEAT1	Ядерная, цитоскелет, вне- клеточная	Положительная регуляция воспа- лительных процессов	miR-124	ELAVL1
SNHG17	Внеклеточная	Способствует делению клеток и росту метастазов	miR-124	CDKN1C

<sup>а</sup>Приведена информация по данным базы PathCards (https://pathcards.genecards.org/).

(табл. 5). miR-27b-3p, в свою очередь, подавляет рост опухолевых клеток, что было показано на клеточных линиях рака молочной железы [27].

Полученные результаты требуют подтверждения на более представительной коллекции образцов. Кроме того, планируется исследовать и сопоставить уровни экспрессии lncPHK и потенциально связанных с ними miPHK на общей выборке образцов.

На основании полученных результатов можно заключить, что скрининг открытых баз данных позволяет обнаружить lncPHK, экспрессия которых ассоциирована с развитием РЯ. Проанализированные нами lncPHK отобраны на основании данных о их возможном взаимодействии с miPHK, вовлеченными в патогенез РЯ. Показано, что гиперэкспрессия четырех lncPHK: lnc-CCL28, LINC00152, NEAT1 и SNHG17 – ассоциирована с развитием РЯ. Экспрессия lnc-CCL28 исследована впервые, при этом обнаружена ее возможная связь с патогенезом и прогрессией РЯ. Также

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

впервые выявлена гиперэкспрессия SNHG17 в опухолях яичников и прогностический потенциал lnc-CCL28 и LINC00152 при РЯ.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 20-15-00368).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам Институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. У всех пациентов получено письменное информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kung J.T.Y., Colognori D., Lee J.T. (2013) Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*. **193**(3), 651–669.

- Brannan C.I., Dees E.C., Ingram R.S., Tilghman S.M. (1990) The product of the *H19* gene may function as an RNA. *Mol. Cell. Biol.* 10(1), 28–36.
- 3. Wunderlich Z., Mirny L.A. (2009) Different gene regulation strategies revealed by analysis of binding motifs. *Trends Genet.* **25**(10), 434–440.
- Yao R.-W., Wang Y., Chen L.-L. (2019) Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* 21(5), 542–551.
- Fang Y., Fullwood M.J. (2016) Roles, functions, and mechanisms of long non-coding RNAs in cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 14(1), 42–54.
- Mercer T.R., Dinger M.E., Mattick J.S. (2009) Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10(3), 155–159.
- López-Urrutia E., Bustamante Montes L.P., Ladrón de Guevara Cervantes D., Pérez-Plasencia C., Campos-Parra A.D. (2019) Crosstalk between long noncoding RNAs, micro-RNAs and mRNAs: deciphering molecular mechanisms of master regulators in cancer. *Front. Oncol.* 9, 669.
- Loginov V.I., Pronina I.V., Burdennyy A.M., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N., Utkin D.O., Khodyrev D.S., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. (2018) Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis. *Gene.* 662, 28–36.
- Филиппова Е.А., Логинов В.И., Бурденный А.М., Брага Э.А., Пронина И.В., Казубская Т.П., Кушлинский Д.Н., Уткин Д.О., Фридман М.В., Ходырев Д.С., Кушлинский Н.Е. (2019) Гиперметилированные гены микроРНК в карциномах яичника: системы маркеров прогноза метастазирования. Бюлл. эксп. биологии и медицины. 167(1), 86–90.
- Zhou J., Zhi X., Wang L., Wang W., Li Z., Tang J., Wang J., Zhang Q., Xu Z. (2016) Erratum to: Linc00152 promotes proliferation in gastric cancer through the EGFR-dependent pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35, 30.
- 11. Seo D., Kim D., Kim W. (2019) Long non-coding RNA linc00152 acting as a promising oncogene in cancer progression. *Genomics Inform.* **17**(4), e36.
- Cai Q., Wang Z.-Q., Wang S.-H., Li C., Zhu Z.-G., Quan Z.-W., Zhang W.-J. (2016) Upregulation of long non-coding RNA LINC00152 by SP1 contributes to gallbladder cancer cell growth and tumor metastasis via PI3K/AKT pathway. *Am. J. Transl. Res.* 8(10), 4068– 4081.
- Shigemasa K., Katoh O., Shiroyama Y., Mihara S., Mukai K., Nagai N., Ohama K. (2002) Increased MCL-1 expression is associated with poor prognosis in ovarian carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res. Gann.* **93**(5), 542–550.
- Chakravarty D., Sboner A., Nair S.S., Giannopoulou E., Li R., Hennig S., Mosquera J.M., Pauwels J., Park K., Kossai M., MacDonald T.Y., Fontugne J., Erho N., Vergara I.A., Ghadessi M., Davicioni E., Jenkins R.B., Palanisamy N., Chen Z., Nakagawa S., Hirose T., Bander N.H., Beltran H., Fox A.H., Elemento O., Rubin M.A. (2014) The oestrogen receptor alpha-regulated lncRNA NEAT1 is a critical modulator of prostate cancer. *Nat. Commun.* 5, 5383.
- 15. Lebedeva S., Jens M., Theil K., Schwanhäusser B., Selbach M., Landthaler M., Rajewsky N. (2011) Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of

the RNA-binding protein HuR. *Mol. Cell.* **43**(3), 340–352.

- 16. Mitsunari K., Miyata Y., Asai A., Matsuo T., Shida Y., Hakariya T., Sakai H. (2016) Human antigen R is positively associated with malignant aggressiveness via upregulation of cell proliferation, migration, and vascular endothelial growth factors and cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Transl. Res.* **175**, 116–128.
- Du Y., Wei N., Hong J., Pan W. (2020) Long non-coding RNASNHG17 promotes the progression of breast cancer by sponging miR-124-3p. *Cancer Cell Int.* 20, 40.
- Smyth G.K. (2005) limma: Linear Models for Microarray Data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Statistics for Biology and Health.* Eds. Gentleman R., Carey V.J., Huber W., Irizarry R.A., Dudoit S. New York: Springer. 397–420. https://doi.org/10.1007/0-387-29362-0\_23
- Pearson K.F.R.S (1901) LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* 2(11), 559–572. https://doi.org/10.1080/14786440109462720
- Hinton G.E., Roweis S. (2002) Stochastic neighbor embedding. Adv. Neural Inf. Process. Syst. 15, 857–864.
- Chen T., Guestrin C. (2016) XGBoost: A Scalable Tree Boosting System. Proceedings of the 22<sup>nd</sup> ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining. 785–794. https://doi.org/10.1145/2939672.2939785
- (1987) TNM Classification of Malignant Tumours, 4<sup>th</sup> edition. Eds Hermanek P., Sobin L.H. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- (2014) WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, vol. 6, 4<sup>th</sup> edition. Eds Kurman R., Carcangiu M.L., Herrington C.S., Young R.H. Lyon: IARC Press.
- Пронина И.В., Логинов В.И., Ходырев Д.С., Казубская Т.П., Брага Э.А. (2012) Уровень экспрессии гена *RASSF1A* в первичных эпителиальных опухолях разной локализации. *Молекуляр. биология*. 46(2), 260–268. https://doi.org/10.1134/S0026893312010189
- Chai Y., Liu J., Zhang Z., Liu L. (2016) HuR-regulated lncRNA NEAT1 stability in tumorigenesis and progression of ovarian cancer. *Cancer Med.* 5(7), 1588– 1598.
- Gong J., Zhang J.-P., Li B., Zeng C., You K., Chen M.-X., Yuan Y., Zhuang S.-M. (2013) MicroRNA-125b promotes apoptosis by regulating the expression of Mcl-1, Bcl-w and IL-6R. *Oncogene*. 32(25), 3071–3079.
- Chen D., Si W., Shen J., Du C., Lou W., Bao C., Zheng H., Pan J., Zhong G., Xu L., Fu P., Fan W. (2018) miR-27b-3p inhibits proliferation and potentially reverses multi-chemoresistance by targeting CBLB/GRB2 in breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 9(2), 188. https://doi.org/10.1038/s41419-017-0211-4

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

# IDENTIFICATION OF NOVEL DIFFERENTIALLY EXPRESSING LONG NON-CODING RNAs WITH ONCOGENIC POTENTIAL

O. I. Brovkina<sup>1, 2, \*</sup>, I. V. Pronina<sup>1</sup>, L. A. Uroshlev<sup>1, 3</sup>, M. V. Fridman<sup>3</sup>, V. I. Loginov<sup>1</sup>, T. P. Kazubskava<sup>4</sup>, D. O. Utkin<sup>4</sup>, N. E. Kushlinskii<sup>4</sup>, and E. A. Braga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia <sup>2</sup>Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Aid and Medical Technologies, FMBA of Russia, Moscow, 115682 Russia <sup>3</sup>Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117971 Russia

<sup>4</sup>Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 115478 Russia \*e-mail: brov.olia@gmail.com

Recently, lots of data have been accumulating on a role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in fine-tuning mRNA expression. Four new lncRNAs, namely, TMEM92-AS1, FAM222A-AS, TXLNB, and lnc-CCL28, were identified as differentially expressed in ovarian tumors with help of deep machine learning. The levels of the lnc-CCL28 transcripts both in tumors and in normal tissue samples were sufficient for further analysis by RT-PCR. In addition, promising ovarian cancer biomarkers lncRNAs LINC00152, NEAT1 and SNHG17 were added to RT-PCR analysis. For the first time, an increase in the level of lnc-CCL28 and SNHG17 lncRNAs was found in ovarian tumors, and the overexpression of LINC00152 and NEAT1 was confirmed. It seems that lnc-CCL28 is involved in carcinogenesis in general and in ovarian cancer progression in particular. Overexpression of LINC00152 and lnc-CCL28 was significantly associated with later stages and metastasis.

Keywords: long non-coding RNAs, deep machine learning, differential expression, oncogenic potential, prognostic marker, lnc-CCL28

# ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

# КОМБИНАЦИЯ *цис*-РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ARE И HRE ПОВЫШАЕТ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОМОТОРА hTERT

© 2021 г. С. В. Калиниченко<sup>*a*</sup>, И. В. Коробко<sup>*a*</sup>, М. В. Шепелев<sup>*b*</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия <sup>b</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия \*e-mail: mshepelev@mail.ru Поступила в редакцию 17.12.2020 г. После доработки 18.02.2021 г.

Принята к публикации 26.02.2021 г.

Опухолеспецифические промоторы и *цис*-регуляторные генетические элементы используют для транскрипционного контроля экспрессии терапевтических трансгенов в генной терапии рака. Цисрегуляторные элементы ответа на гипоксию (HRE) и антиоксидантного ответа (ARE), служащие мишенями транскрипционных факторов HIF1 и Nrf2, соответственно, опосредуют активацию транскрипции генов в ответ на гипоксию и окислительный стресс, присущие многим солидным опухолям. На этом свойстве основано применение элементов HRE и ARE в конструкциях для генной терапии рака с целью обеспечения опухолеспецифической экспрессии терапевтических трансгенов или репликации онколитических аденовирусов. На основе опухолеспецифического промотора hTERT сконструированы гибридные промоторы, несущие комбинации элементов HRE и ARE. Показано, что при имитации гипоксии в клеточных линиях рака легкого человека активность гибридного промотора HRE-ARE-hTERT существенно выше активности промоторов, несущих только HRE или ARE. На модели суицидальной генной терапии рака легкого *in vitro* с использованием системы фермент-пролекарство (цитозиндезаминаза : урацил-фосфорибозилтрансфераза/5-фторцитозин) показано, что при имитации гипоксии цитотоксический эффект от экспрессии цитозиндезаминазы : урацил-фосфорибозилтрансферазы под контролем промотора HRE-ARE-hTERT значимо выше, чем под контролем промоторов HRE-hTERT и ARE-hTERT. Новый гибридный промотор HRE-ARE-hTERT может найти применение для транскрипционного контроля экспрессии терапевтических трансгенов или репликации онколитических аденовирусов при разработке новых геннотерапевтических противоопухолевых средств.

Ключевые слова: элементы HRE, элементы ARE, промотор hTERT, генная терапия рака, гипоксия, окислительный стресс

**DOI:** 10.31857/S0026898421040054

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Клиническое применение генной терапии началось в 1990 году с ретровирусной доставки гена аденозиндезаминазы в Т-лимфоциты пациента с наследственным иммунодефицитом [1]. В настоящее время разрабатываются преимущественно противоопухолевые геннотерапевтические препараты [2]. Важное направление развития технологий и стратегий генной терапии — создание векторов для генной терапии рака [3]. Такие векторы находят применение для экспрессии терапевтических трансгенов при суицидальной генной терапии с использованием систем фермент пролекарство, в которых фермент катализирует превращение нетоксичного пролекарства в токсичный метаболит, убивающий опухолевую клетку [4, 5]. При разработке подходов к генной терапии опухолей проблему представляет достижение оптимальной экспрессии терапевтического трансгена в опухолевых клетках. Это подразумевает определенный уровень продукции терапевтического трансгена для эффективной элиминации опухолевых клеток, а также опухолеспецифичность экспрессии

Сокращения: ARE (antioxidant response element) – элемент антиоксидантного ответа; HRE (hypoxia response element) – элемент ответа на гипоксию; hTERT (telomerase reverse transcriptase) – теломеразная обратная транскриптаза человека; ЦД:УФРТ – слитый белок цитозиндезаминаза : урацил-фосфорибозилтрансфераза; 5ФЦ – 5-фторцитозин; ОЕЛ – относительные единицы люминесценции; СО – стандартное отклонение; З'HTO – З'-нетранслируемая область.

трансгена для минимизации побочного действия геннотерапевтического препарата на неопухолевые клетки [4]. Одна из стратегий обеспечения опухолеспецифической экспрессии трансгенов основана на транскрипционном контроле (transcriptional targeting) за счет использования опухолеспецифических или тканеспецифических промоторов, а также иис-регуляторных генетических элементов или их комбинаций [6]. Например, промотор гена теломеразной обратной транскриптазы человека (hTERT) активен в широком спектре опухолей и используется в транскрипционном контроле терапевтических трансгенов [7], однако это достаточно слабый промотор, что указывает на необходимость повышения его активности с сохранением опухолеспецифичности.

Цис-действующие регуляторные элементы ответа на окислительный стресс (ARE) находят в промоторах генов, кодирующих белки антиоксидантной защиты, ферменты детоксикации, белки-транспортеры ксенобиотиков, которые обеспечивают защиту клеток от окислительного стресса [8]. Фактор транскрипции Nrf2, основной регулятор генов антиоксидантной защиты, связывается с элементами ARE в промоторах генов-мишеней и активирует их транскрипцию. Для опухолевых клеток характерен повышенный уровень продукции активных форм кислорода, обусловленный генетическими или метаболическими изменениями, который сопровождается аберрантной активацией механизмов антиоксидантной защиты и сигнального пути Keap1-Nrf2 [9]. Эти молекулярные изменения лежат в основе использования элементов ARE в генетических конструкциях для генной терапии рака.

В частности, эффективность элементов ARE из гена *GCLM* (glutamate-cysteine ligase modifier subunit) человека в векторах для суицидальной генной терапии показана ранее на мышиной модели рака легкого при модификации минимального промотора SV40 [10]. На клеточных линиях рака легкого нами показано, что ARE-элементы гена *GCLM* повышают активность промотора hTERT, не влияя на опухолеспецифический характер экспрессии [11].

Состояние гипоксии, характерное для большинства солидных опухолей, рассматривается как рациональная основа для использования *цис*-регуляторных элементов ответа на гипоксию (HRE, hypoxia response elements) в геннотерапевтических конструкциях [12]. Элементы HRE присутствуют в промоторах генов, кодирующих белки, обеспечивающие оксигенацию тканей и рост сосудов, и служат мишенью индуцируемого гипоксией гетеродимерного транскрипционного фактора HIF1 (Hypoxia inducible factor 1). В условиях гипоксии стабилизируется субъединица HIF1α, которая связывается с конститутивно экспрессируемой субъединицей HIF1β, формируя транскрипционно активный комплекс [13].

*Цис*-регуляторные элементы HRE достаточно давно применяют в конструкциях для генной терапии рака, чтобы обеспечить опухолеспецифическую экспрессию трансгенов [12]. НRE комбинировали как с минимальными вирусными промоторами, так и с такими цис-регуляторными элементами, как ERE (Estrogen response element) [14-17], или с опухолеспецифическими промоторами, например, с промотором гена α-фетопротеина человека для контроля репликации онколитического вируса [18]. Кроме того, создан ряд онколитических вирусов, несущих HRE-элементы и промотор hTERT. Однако в этом случае промотор и *цис*-регуляторные элементы HRE не были объединены в гибридном промоторе, а контролировали экспрессию различных транскриптов. В частности, ген Е1А аденовируса находился под контролем промотора hTERT, а ген E1B – под контролем элемента HRE [19-22].

Таким образом, каждый из элементов – ARE и HRE – способен обеспечить опухолеспецифическую экспрессию трансгена, однако до настоящего времени комбинацию этих элементов в векторах для генной терапии рака не применяли. Предположили, что комбинация ARE и HRE может повысить активность опухолеспецифического промотора hTERT и эффективность суицидальной генной терапии по сравнению с использованием только одного генетического элемента.

Таким образом, цель данной работы состояла в изучении влияния комбинации *цис*-регуляторных элементов ARE и HRE на активность опухолеспецифического промотора hTERT и эффективность генной терапии рака на модели суицидальной генной терапии *in vitro* с использованием ЦД:УФРТ/5ФЦ в качестве системы фермент пролекарство.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмиды. В работе использовали плазмиды pGL3-Basic и pRL-TK компании "Promega", США. Плазмиды phTERT-Luc и pARE-hTERT-Luc, кодирующие репортерный ген люциферазы под контролем промоторов hTERT и ARE-hTERT, и плазмида pCR-3DNMT1, несущая 3'HTO транскрипта гена ДНК-метилтрансферазы 1 человека (DNMT1) описаны ранее [11, 23, 24]. Плазмида pCI-FCU1, несушая кДНК ЦД:УФРТ, и полученная на основе вектора pCI "Promega", любезно предоставлена М. Костиной (ИБХ РАН). Для получения плазмиды p2×HRE-Luc, кодирующей ген люциферазы под контролем двух копий HREэлемента длиной 22 п.н. из гена LdhA мыши, синтетические одноцепочечные олигонуклеотиды (5'-ccggagctcCGGACGTGCGGGAACCCACGTGaaC-

GGACGTGCGGGAACCCACGTGcagct-3' и 5'-gCAC-GTGGGTTCCCGCACGTCCGttCACGTGGGTTC-CCG<u>CACGT</u>CCGgagctccgggtac-3' (HRE-элемент выделен заглавным шрифтом, коровая последовательность HRE подчеркнута) гибридизовали для формирования двухцепочечного олигонуклеотида с липкими концами и клонировали по сайтам KpnI-SacI в вектор pGL3-Basic. Для получения плазмид, экспрессирующих люциферазу под контролем четырех и шести копий HRE-элементов (p4×HRE-Luc и p6×HRE-Luc соответственно), те же двухцепочечные олигонуклеотиды клонировали по сайтам KpnI-SacI в плазмиды p2×HRE-Luc и p4×HRE-Luc соответственно. Плазмиду pHRE-hTERT-Luc получали путем клонирования промотора hTERT из вектора phTERT-Luc по сайтам XhoI–HindIII в плазмиду p6×HRE-Luc. Фрагмент Ecl136I-SmaI из плазмиды p6×HRE-Luc клонировали в плазмиду pARE-hTERT-Luc по сайтам EcoRV или KpnI (обработан Т4-ДНК-полимеразой), получая плазмиды pARE-HRE-hTERT-Luc и pHRE-ARE-hTERT-Luc cootветственно.

Плазмилы для экспрессии химерного белка ЦД:УФРТ конструировали на основе векторов pBK-CMV и pBluescriptII SK(-), оба "Stratagene" США. С этой целью на матрице плазмид pAREhTERT-Luc, pCI-FCU1 и pCR-DNMT1 с помощью ПЦР амплифицировали нуклеотидные последовательности элемента ARE (праймеры 5'-ggtaccgtcgactgagtaacggttacgaagc-3' и 5'-aagcttaagatatcaagacaatgactaagcagaa-3'), промотора hTERT (5'-ggtaccgatatccacagacgcccaggac-3' и 5'-aagcttaaagtcgacccacgtgcgcagcagg-3'), химерного интрона из вектора pCI (5'-aagcttgaagttggtcgtgaggca-3' и 5'-gaattcaattgaactgggagtggac-3'), кДНК ЦД : УФРТ (5'-ggtaccaagcttgaattccaccatggtgaca-3' и 5'-gcggccgctcgactcgagttaaacacagtagtatctgt-3') и 3'HTO из гена DNMT1 человека (5'-atgcggccgctgtttctggcaccaggaat-3' и 5'-attctagacttaagtggtttataggagagattta-3') и клонировали продукты ПЦР в вектор pCR-Blunt ("Invitrogen", США). Полученные плазмиды полностью секвенировали. Далее в вектор pBK-CMV клонировали З'НТО DNMT1 по сайтам NotI-XbaI, из полученного вектора удаляли фрагмент Sall-XhoI, вектор лигировали сам на себя. В полученную плазмиду клонировали кДНК ЦД:УФРТ по сайтам KpnI–NotI, затем химерный интрон по сайтам HindIII–EcoRI, получая вектор pBK-INT-FCU1-3DNMT1, в который клонировали промотор hTERT по сайтам KpnI-HindIII, получая вектор pBK-hTERT-INT-FCU1-3DNMT1. Экспрессионные кассеты клонировали из векторов на основе pBK-CMV в вектор pBluescriptII SK(-) по сайтам KpnI–SacI, получая плазмиды pBl-INT-FCU1-3DNMT1 (контрольная плазмида без промотора) и pBl-hTERT-INT-FCU1-3DNMT1. Вектор pBl-ARE-hTERT-INT-FCU1-3DNMT1 получали путем клонирования ARE элемента в вектор pBK-INT-FCU1-3DNMT1 по сайтам KpnI-HindIII,

последующего клонирования экспрессионной кассеты по сайтам KpnI–SacI в pBluescriptII SK(-) и клонирования промотора hTERT в полученный вектор по сайтам EcoRV-HindIII. Плазмиду pBl-HRE-ARE-hTERT-INT-FCU1-3DNMT1 получали путем клонирования фрагмента Ecl136I-SmaI с элементами HRE из плазмиды p6×HRE-Luc в вектор pBI-ARE-hTERT-INT-FCU1-DNMT1 по сайту КрпІ. обработанному Т4-ДНК-полимеразой. Плазмилу pBI-HRE-hTERT-INT-FCU1-3DNMT1 получали путем клонирования Ecl136I-HindIII (обработан фрагментом Кленова) фрагмента из вектора p6×HRE-hTERT-Luc в плазмиду pBl-INT-FCU1-3DNMT1 по сайту HindIII (обработан фрагментом Кленова). Плазмилу pBl-ARE-HREhTERT-INT-FCU1-DNMT получали путем клонирования HincII-HincII-фрагмента из плазмиды pARE-HRE-hTERT-Luc в вектор pBI-INT-FCU1-3DNMT по сайту HindIII (обработан фрагментом Кленова). Плазмидную ДНК из клеток Escherichia coli выделяли с использованием набора GenElute Plasmid MiniPrep Kit ("Sigma", США) в соответствии с протоколом производителя.

Культуры клеток. Клетки линий NCI-H1299 (АТСС #CRL-5803), Calu-1 (ЕСАСС, #93120818) и А549 (АТСС, #CRL-185) культивировали в среде DMEM/F12 ("HyClone", США) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки ("Hy-Clone"), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина ("Gibco", США). Клетки транс-фицировали плазмидной ДНК, используя реагент EcoTransfect ("OZ Bioscience", Франция).

Люциферазный анализ. Клетки линий NCI-H1299, Calu-1 и А549 рассевали в лунки 24-луночного планшета в плотности 20000, 40000 и 30000 клеток на лунку, соответственно, в трех повторах для каждой экспериментальной точки. На следующий день клетки трансфицировали смесью указанных репортерных плазмид, экспрессирующих люциферазу светлячка, вместе с плазмидой pRL-TK, экспрессирующей люциферазу Renilla под контролем промотора гена тимидинкиназы вируса простого герпеса. Через 24 ч после трансфекции меняли среду и инкубировали клетки в присутствии 100 мкМ CoCl<sub>2</sub> или без добавления CoCl<sub>2</sub> в течение 24 ч, после чего измеряли активности люцифераз с помощью набора pearentoв Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System "Promega" в соответствии с протоколом производителя на люминометре GloMax 20/20 "Promega". Активность люциферазы светлячка нормировали по активности люциферазы Renilla, вычисляли среднее значение люминесценции (ОЕЛ) и стандартное отклонение (СО).

Измерение цитотоксического эффекта. Оценку цитотоксического эффекта в схеме суицидальной генной терапии *in vitro* на основе системы фермент-пролекарство ЦД:УФРТ/5ФЦ проводили

609

на клеточных линиях рака легкого человека. В первый день клетки линий NCI-H1299, A549 и Calu-1 рассевали в 1 мл среды в лунки 12-луночного планшета в плотности 40000, 60000 и 80000 клеток на лунку соответственно. На второй день клетки трансфицировали соответствующими плазмидами. На третий день трансфицированные клетки рассевали в 96-луночный планшет в плотности 1200, 1800 и 2400 клеток на лунку в 100 мкл среды (по три повтора для каждой экспериментальной точки). На четвертый день к клеткам добавляли CoCl<sub>2</sub> и/или 5ФЦ и инкубировали в течение 3 суток в присутствии 100 мкМ CoCl<sub>2</sub> и/или 200 мкМ (NCI-H1299), или 500 мкМ (А549, Calu-1) 5ФЦ, либо без добавления CoCl<sub>2</sub> и 5ФЦ. На восьмой день меняли культуральную среду на свежую, содержащую CoCl<sub>2</sub> и 5ФЦ, как указано выше. На девятый день измеряли количество живых клеток в лунках. используя набор реагентов CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay ("Promega"). Вычисляли среднее количество живых клеток в лунках, выраженное в относительных единицах (OE), и стандартное отклонение (СО). Статистическую значимость различий между средними значениями количества живых клеток оценивали с помощью двунаправленного непарного *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Выбор элементов HRE

Элементы HRE находят в промоторах многих индуцируемых гипоксией генов, таких как ЕРО (эритропоэтин), VEGFA (фактор А роста сосудистого эндотелия), PGK1 (фосфоглицераткиназа 1), LDHA (лактатдегидрогеназа А) [25]. Коровая последовательность HRE состоит из пяти нуклеотидов (5'-ACGTG-3') и может располагаться в любой ориентации относительно сайта инициации транскрипции [26]. В условиях гипоксии, как показано ранее, нативные HRE из промотора гена LdhA мыши обеспечивают бо́льшую индукцию репортерного гена по сравнению с часто используемыми элементами HRE из гена PGK1 человека. Аденовирус, экспрессирующий терапевтический трансген под контролем комбинации минимального промотора и HRE из гена LdhA, вызывал эффективную регрессию опухоли в мышиной модели [27]. Поэтому для включения в гибридный промотор выбрали элемент HRE длиной 22 п.н. из гена LdhA мыши (5'-CGGACGTGCGGGAAC-СС<u>АСGTG</u>-3'), расположенный в геноме в обратной ориентации относительно сайта инициации транскрипции и несущий две копии корового HRE-элемента (подчеркнут). Элемент HRE расположен в положении -27...-48 относительно сайта начала транскрипции для мРНК гена *LdhA* мыши (NM 010699.2).

#### Анализ активности элементов HRE из гена LdhA

Функциональность выбранных HRE-элементов гена *LdhA* мыши анализировали, используя плазмидные конструкции на основе беспромоторного вектора pGL3-Basic, несущие репортерный ген люциферазы под контролем двух, четырех и шести копий HRE-элемента (плазмиды p2×HRE-Luc, p4×HRE-Luc и p6×HRE-Luc соответственно, рис. 1). Определена активность люциферазы в транзиторно трансфицированных клетках линии NCI-H1299 в отсутствие или в присутствии 100 мкМ хлорида кобальта, обработка которым стабилизирует транскрипционный фактор HIF1α, имитируя тем самым условия гипоксии [28]. Установлено, что элементы HRE из гена LdhA мыши способны активировать транскрипцию репортерного гена, а степень его активации пропорциональна числу HRE-элементов (рис. 1), что характерно и для HRE из других генов [25]. Обработка хлоридом кобальта вызывала умеренное увеличение активности репортерного гена. Полученные данные указывают на то, что элемент HRE из гена LdhA функционален и способен активировать транскрипцию даже в отсутствие минимального промотора. С целью дальнейшего использования в генетических конструкциях для генной терапии выбран вариант, несущий шесть копий HRE и обладающий максимальной транскрипционной активностью (рис. 1).

#### Анализ активности гибридных промоторов с комбинацией цис-регуляторных элементов ARE и HRE

Для оценки возможного синергизма в действии ARE- и HRE-элементов на активность опухолеспецифического промотора hTERT получены плазмиды, экспрессирующие репортерный ген люциферазы под контролем ARE из гена *GCLM* человека и шести копий HRE-элемента, при дистальном и проксимальном расположении HRE-элемента относительно ARE (рис. 2*a*). Активность репортерного гена люциферазы, под контролем вариантов промотора hTERT анализировали в клетках линий рака легкого человека NCI-H1299, Calu-1 и A549, обработанных хлоридом кобальта в течение 24 ч для имитации гипоксии или без нее.

В отсутствие имитации условий гипоксии (об-

разцы  $CoCl_2^-$ ) добавление ARE- и HRE-элементов или их комбинаций незначительно повышало активность промотора hTERT (в 1.6 раза для ARE-hTERT и HRE-hTERT и ~2 раза для ARE-HRE-hTERT и HRE-hTERT) в клетках линии NCI-H1299, при этом активность промоторов с комбинацией *цис*-элементов была статистически значимо выше активности промоторов, несущих лишь один *цис*-элемент (рис. 26). Обработ-

ка хлоридом кобальта (образцы CoCl<sub>2</sub><sup>+</sup>) не влияла



**Рис. 1.** Анализ активности репортерного гена люциферазы под контролем двух, четырех и шести копий HRE-элементов из гена *LdhA* мыши. Данные показаны в относительных единицах люминесценции (ОЕЛ) для люциферазы светлячка после нормирования по активности люциферазы *Renilla* как среднее значение для трех экспериментальных точек  $\pm$  CO. Светло-серый цвет (–) – необработанные клетки; темно-серый цвет (+) – клетки, культивируемые в присутствии 100 мкМ хлорида кобальта (CoCl<sub>2</sub>) в течение 24 ч перед анализом активности люциферазы. Показаны результаты одного репрезентативного эксперимента (два независимых повтора).

на активность промотора hTERT и вызывала умеренную активацию промоторов ARE-hTERT и HRE-hTERT. Обработка хлоридом кобальта приводила к 1.7–2.0-кратной активации промоторов с комбинацией *цис*-регуляторных элементов (ARE-HRE-hTERT и HRE-ARE-hTERT). При этом активность промоторов с комбинацией *цис*-элементов была значимо выше, чем промоторов ARE-hTERT и HRE-hTERT (рис. 26).

#### В клетках линии Calu-1 в отсутствие имитации

гипоксии (образцы  $CoCl_2^-$ ) добавление ARE повышало активность промотора hTERT в 3.8 раза (ARE-hTERT), добавление HRE-элемента не вызывало существенного эффекта (активация в 1.5 раза (HRE-hTERT)), а активность промоторов с комбинациями элементов ARE и HRE не отличалась статистически значимо от активности промотора ARE-hTERT (рис. 2*г*). Обработка хлоридом

кобальта (образцы  $\text{CoCl}_2^+$ ) не влияла на активность промотора hTERT, но вызывала существенную активацию остальных гибридных промоторов. При этом активности промоторов ARE-hTERT, HRE-hTERT и ARE-HRE-hTERT не различались статистически значимо, а активность промотора HRE-ARE-hTERT была примерно в 2 раза выше активности промотора ARE-hTERT (рис. 2r) и в 9.88 раза выше активности немодифицированного промотора hTERT (рис. 2r).

В клетках линии A549 активность промотора ARE-hTERT примерно в 2 раза превышала актив-

ность промотора hTERT как при имитации гипоксии, так и в нормальных условиях, что соответствует данным [11]. Не выявлено значимых различий в активности HRE-hTERT, ARE-HRE-hTERT и HRE-ARE-hTERT по сравнению с промотором hTERT как при имитации гипоксии, так и в нормальных условиях (рис. 2*в*).

Таким образом, в клеточных линиях NCI-H1299 и Calu-1 рака легкого человека максимальная активность репортерного гена люциферазы детектировалась при использовании промотора HRE-ARE-hTERT в условиях, имитирующих гипоксию.

### Повышение эффективности суицидальной генной терапии рака в схеме фермент—пролекарство in vitro при использовании гибридного промотора с комбинацией HRE- и ARE-элементов

Далее эффективность новых гибридных промоторов с комбинациями HRE- и ARE-элементов оценивали *in vitro* на модели суицидальной генной терапии фермент—пролекарство ЦД:УФРТ/5ФЦ в клетках рака легкого человека. Клетки трансфицировали плазмидами, экспрессирующими ЦД:УФРТ под контролем различных вариантов гибридных промоторов, и контрольной плазмидой без промотора (рис. 3*a*). Все экспрессионные конструкции включали химерный интрон из вектора рСІ ("Promega") для повышения уровня экспрессии ЦД:УФРТ и 3'НТО из гена *DNMT1* человека, которая способствует повышению опухолеспеци-



**Рис. 2.** Повышение активности опухолеспецифического промотора hTERT в клеточных линиях рака легкого человека за счет комбинирования *цис*-регуляторных элементов HRE и ARE. a - Cхемы плазмидных конструкций для экспрессии люциферазы (Luc) светлячка под контролем вариантов промотора hTERT. Все плазмиды содержали 3'-HTO вируса SV40 (3SV40).  $\delta - e - A$ нализ активности репортерного гена люциферазы под контролем вариантов промотора hTERT в клетхах линий NCI-H1299 ( $\delta$ ), A549 ( $\theta$ ) и Calu-1 (e). Активность люциферазы светлячка показана в относительных единицах люминесценции (OEЛ) после нормирования на активность люциферазы *Renilla* (приведены средние значения для трех экспериментальных точек  $\pm$  CO). Светло-серый цвет (-) – необработанные клетки; темно-серый цвет (+) – клетки, культивируемые в присутствии 100 мкМ хлорида кобальта (CoCl<sub>2</sub>) в течение 24 ч перед определением активности люциферазы. Показаны результаты одного репрезентативного эксперимента из двух независимых повторов.

фичности экспрессии трансгена [24]. Клетки инкубировали в присутствии пролекарства 5ФЦ и хлорида кобальта для имитации гипоксии, и оценивали цитотоксический эффект от экспрессии терапевтического трансгена ЦД:УФРТ.

В клетках линии NCI-H1299 цитотоксический эффект экспрессии ЦД:УФРТ под контролем промотора ARE-HRE-hTERT наблюдали даже при инкубации клеток с 5ФЦ в отсутствие имитации гипоксии (рис. 36, ARE-HRE-hTERT; 5ФЦ– и 5ФЦ+; p = 0.0256). При инкубации клеток с 5ФЦ в условиях, имитирующих гипоксию, отмечали существенный цитотоксический эффект экспрессии ЦД:УФРТ под контролем промоторов ARE-hTERT (p = 0.0007), HRE-hTERT (p = 0.0204), ARE-HREhTERT (p = 0.0294) и HRE-ARE-hTERT (p == 0.0001), но не при использовании немодифицированного промотора hTERT или в отсутствие промотора (рис. 3 $\epsilon$ ). При этом цитотоксический эффект при использовании промотора HRE-ARE-hTERT был статистически значимо выше, чем при экспрессии ЦД:УФРТ под контролем промоторов ARE-hTERT и HRE-hTERT (рис. 3 $\epsilon$ ).



**Рис. 3.** Модификация опухолеспецифического промотора hTERT с помощью комбинации HRE- и ARE-элементов усиливает цитотоксическое действие терапевтического трансгена в модели суицидальной генной терапии *in vitro* с использованием системы фермент–пролекарство ЦД:УФРТ/5ФЦ. *a* – Схемы плазмидных конструкций для экспрессии химерного белка ЦД:УФРТ (CD:UPRT). Все плазмиды содержали гибридный интрон (INT) и 3'HTO из транскрипта гена *DNMT1* человека (3DNMT1). *б*, *e* – Клетки линии NCI-H1299 инкубировали (*б*) без CoCl<sub>2</sub> (0 мкМ CoCl<sub>2</sub>) в присуствии 200 мкМ 5ФЦ (5ФЦ+) или без добавления 5ФЦ (5ФЦ–), либо (*e*) в присутствии 100 мкМ CoCl<sub>2</sub> и 200 мкМ 5ФЦ (5ФЦ+) или без добавления 5ФЦ (5ФЦ–), либо (*b*) в присутствии 100 мкМ CoCl<sub>2</sub> (0 мкМ CoCl<sub>2</sub>) в присуствии 500 мкМ 5ФЦ (5ФЦ+) или без добавления 5ФЦ (5ФЦ–). *г*, *d* – Клетки линии Calu-1 инкубировали либо (*c*) без CoCl<sub>2</sub> (0 мкМ CoCl<sub>2</sub>) и 500 мкМ 5ФЦ (5ФЦ+) или без добавления 5ФЦ (5ФЦ–). Приведены средние значения количества живых клеток в трех лунках для каждой экспериментальной точки относительно клеток, трансфицированных той же плазмидой, но инкубированных без добавления 5ФЦ, (OE ± CO). Показаны результаты одного репрезентативного эксперимента из двух независимых повторов. Экспериментальные точки, количество живых клеток в которых различалось статистически значимо (*p* < 0.05; двунаправленный *t*-критерий Стьюдента), отмечены знаком \*.

Экспрессия ЦД:УФРТ под контролем промотора hTERT и всех его модификаций (но не в составе беспромоторной конструкции) приводила к умеренному, но статистически значимому снижению количества живых клеток линии Calu-1 при добавлении 500 мкМ 5ФЦ только при инкубации клеток в присутствии 100 мкм  $CoCl_2$  (рис. 3*г*, *д*). Однако в клетках Calu-1, в отличие от клеток NCI-H1299, не выявлено значимых различий в цитотоксическом эффекте 5ФЦ при использовании промоторов с отдельными *цис*-элементами и их комбинациями.

Культивирование клеток линии А549 в присутствии 5ФЦ, но без имитации гипоксии не приводило к развитию цитотоксического эффекта, по сравнению с клетками, трансфицированных теми же плазмидами, но инкубуемых без 5ФЦ. При инкубации клеток А549 с 5ФЦ в присутствии 100 мкМ хлорида кобальта наблюдали статистически значимый (p = 0.00274; двунаправленный *t*-критерий Стьюдента) цитотоксический эффект, вызванный экспрессией ЦД:УФРТ под контролем промотора HRE-hTERT, по сравнению с клетками, инкубированными без 5ФЦ. Цитотоксический эффект при использования промоторов с комбинацией элементов HRE и ARE не был статистически значимым (данные не показаны).

Таким образом, результаты, полученные на клеточной линии NCI-H1299, указывают на то, что гибридный промотор HRE-ARE-hTERT наиболее эффективен при экспрессии терапевтического трансгена в схеме суицидальной генной терапии рака легкого *in vitro* с использованием системы фермент—пролекарство (ЦД:УФРТ/5ФЦ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Опухолеспецифический промотор hTERT достаточно давно находит применение в генетических конструкциях для генной терапии рака в силу того, что реактивация экспрессии гена TERT характерна для широкого спектра опухолей человека [29]. Однако промотор hTERT достаточно слабый, а его активность варьирует в зависимости от клеточных линий [23]. С целью поиска способов повышения активности промотора hTERT и создания более универсального опухолеспецифического промотора, активного в различных опухолях, мы оценили влияние комбинации ранее охарактеризованных элементов ARE из гена GCLM человека [10, 11, 30] и HRE-элементов из гена LdhA мыши [27] на активность промотора hTERT и эффективность суицидальной генной терапии рака с использованием системы фермент-пролекарство ЦД:УФРТ/5ФЦ in vitro.

Активность гибридных промоторов, несущих комбинации ARE и HRE, проанализировали в клеточных линиях рака легкого человека – NCI-H1299, Calu-1 и A549, высокий уровень ARE-зависимой транскрипции в которых обусловлен аберрантной активацией фактора транскрипции Nrf2 [11]. Показано, что в клеточной линии NCI-H1299 (как при имитации гипоксии, так и в нормальных условиях) активность промоторов с комбинацией

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

цис-действующих элементов (HRE-ARE-hTERT и ARE-HRE-hTERT) значимо выше, чем у промоторов, несущих лишь один из иис-регуляторных элементов. Не выявлено значимых различий в активности промоторов, несущих один цис-элемент или их комбинацию, в клетках линии Calu-1 в отсутствие имитации гипоксии. Однако при обработке клеток хлоридом кобальта отмечено существенное повышение активности промоторов, несущих как отдельные цис-элементы, так и их комбинации, а активность промотора HRE-AREhTERT была статистически значимо выше активности промотора ARE-hTERT (рис. 2г). Совокупность полученных результатов свидетельствует о синергическом действии цис-элементов ARE и HRE в контроле транскрипции репортерного гена люциферазы в клеточных линиях рака легкого. Это действие может проявляться как при имитации гипоксии, так и в нормальных условиях (клетки NCI-H1299) или только при имитации гипоксии (клетки Calu-1).

Известно, что промотор гена TERT человека содержит HRE-элементы и активируется в ответ на гипоксию [31]. Однако регуляция транскрипции гена TERT опосредована многими транскрипционными факторами, например, аберрантно активированным МҮС, а также эпигенетическими механизмами [32]. Мы не обнаружили активацию репортерного гена под контролем промотора hTERT в клетках, обработанных хлоридом кобальта (рис. 2). По всей видимости, стабилизация фактора HIF-1 $\alpha$ под действием хлорида кобальта не вносит существенного вклада в базальный уровень активности промотора hTERT в использованных клеточных линиях. Важно отметить, что существенная активация репортерного гена в ответ на обработку хлоридом кобальта отмечалась только после модификации промотора hTERT (добавление элементов ARE и HRE или их комбинации), но не при использовании немодифицированного промотора hTERT (рис. 26,  $\epsilon$ ). При этом максимальную активность промотора обеспечивала комбинация элементов HRE и ARE.

Оценка эффективности гибридных промоторов на модели суицидальной генной терапии in vitro на основе системы фермент-пролекарство ЦД:УФРТ/5ФЦ показала, что экспрессия ЦД:УФРТ под контролем промотора HRE-AREhTERT вызывает цитотоксический эффект в клетках линии NCI-H1299, инкубируемых в присутствии 5ФЦ в условиях имитации гипоксии. Этот эффект был сушественно выше эффекта, наблюдаемого при экспрессии ЦД:УФРТ под контролем промоторов, несущих только один из цис-действующих элементов (рис. 3в). Однако использование комбинации элементов HRE и ARE не привело к статистически значимому усилению цитотоксического эффекта в клетках линии Calu-1 в условиях имитации гипоксии, несмотря на то что по результатам измерения активности люциферазы промотор HRE-ARE-hTERT был значимо активнее промотора ARE-hTERT. Это может быть обусловлено менее эффективной трансфекцией клеток Calu-1 по сравнению с NCI-H1299 и тем, что в отличие от определения активности люциферазы, цитотоксический эффект измеряли через 8 дней после трансфекции. За это время часть клеток может утратить трансфицированные плазмиды. Кроме того, клетки линии Calu-1 менее чувствительны к 5ФЦ, и для развития выраженного цитотоксического эффекта при экспрессии ЦД:УФРТ под контролем промотора ARE-hTERT требуется инкубация в присутствии 500–1000 мкМ 5ФЦ, в отличие от клеток NCI-H1299, существенный цитотоксический эффект в которых детектируется уже при 50-100 мкМ 5ФЦ [11]. В клетках линии А549 статистически значимый цитотоксический эффект выявлен лишь при использовании промотора HRE-hTERT и инкубации клеток в присутствии 5ФЦ и хлорида кобальта. Отсутствие существенного влияния комбинации иис-элементов на активность репортерного гена люциферазы в клетках А549 коррелирует в данном случае с отсутствием цитотоксического эффекта в схеме суицидальной генной терапии.

Таким образом, в схеме суицилальной генной терапии рака легкого in vitro с использованием системы фермент-пролекарство ЦД:УФРТ/5ФЦ в клетках линии NCI-H1299 в условиях имитации гипоксии гибридный промотор HRE-ARE-hTERT был более эффективным, чем промоторы, несущие лишь один иис-регуляторный элемент. В совокупности с результатами люциферазного анализа это свидетельствует о синергичном действии элементов HRE и ARE. Важно отметить, что мы имитировали условия гипоксии с помощью простой и доступной обработки клеток хлоридом кобальта. Можно предположить, что в условиях реальной гипоксии активность гибридного промотора HRE-ARE-hTERT и эффективность суицидальной генной терапии могут существенно возрасти.

Элементы ARE находят применение не только в генной терапии рака, но и в терапии сердечно-сосудистых патологий, ассоциированных с повышенной генерацией активных форм кислорода [30]. Подход, основанный на комбинировании элементов ARE и HRE, был применен ранее в генной терапии ишемического инсульта. В частности, создан вектор, экспрессирующий фактор транскрипции Nrf2 под контролем минимального шитомегаловирусного промотора, несуший комбинацию HRE-элементов из гена VEGF и элементов ARE из гена глутатион-S-трансферазы [33]. В этой экспериментальной системе именно комбинация элементов ARE и HRE обеспечивала максимальную защиту нейронов от гибели [33], что согласуется с результатами нашей работы. Cheng и соавт. [33] использовали систему фермент-пролекарство HSV-tk/ганцикловир, ARE и HRE других генов, модифицировали минимальный цитомегаловирусный промотор. Важно отметить, что именно в нашей работе впервые показан синергизм в действии элементов ARE и HRE в составе опухолеспецифического промотора hTERT на модели суицидальной генной терапии рака легкого.

Нами показана принципиальная возможность повышения активности опухолеспецифического промотора для генной терапии рака с помощью комбинации *цис*-регуляторных элементов ARE и HRE. Дальнейшая оптимизация предложенного подхода может включать анализ активности комбинаций элементов ARE и HRE из других генов и комбинаций ARE и HRE с другими опухолеспецифическими или тканеспецифическими промоторами. Все это может существенно повысить эффективность предложенного подхода к генной терапии рака на основе комбинирования элементов ARE и HRE.

В данной работе мы сконструировали новый гибридный промотор для генной терапии рака путем комбинирования цис-действующих генетических элементов ARE и HRE и опухолеспецифического промотора hTERT. Показано, что в клеточной линии NCI-H1299 рака легкого человека активность гибридного промотора HRE-ARE-hTERT существенно выше активности промоторов, несущих лишь один цис-элемент, как при имитации гипоксии, так и в нормальных условиях, а в клетках линии Calu-1 активность гибридного промотора HRE-ARE-hTERT статистически значимо превышала активность промотора ARE-hTERT, но не HRE-hTERT, только при имитации гипоксии. На клетках NCI-H1299 установлено, что промотор HRE-ARE-hTERT более эффективен в схеме суицидальной генной терапии рака легкого in vitro с использованием системы фермент-пролекарство ЦД:УФРТ/5ФЦ по сравнению с промоторами ARE-hTERT и HRE-hTERT. Полученные данные позволяют рассматривать HRE-ARE-hTERT как перспективный промотор для дальнейшей разработки противоопухолевых генотерапевтических препаратов. Промотор HRE-ARE-hTERT может найти применение в контроле экспрессии трансгенов в системах фермент-пролекарство или при создании онколитических аденовирусов, что будет способствовать повышению эффективности генной терапии рака и расширению спектра онкологических заболеваний, к которым применима генная терапия.

Данная работа поддержана грантом № 075-15-2019-1661 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

В работе использована инфраструктура Центра коллективного пользования Института биологии гена Российской академии наук В работе не использованы животные или биологические материалы, полученные от людей.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D., Carter C.S., Fleisher T., Clerici M., Shearer G., Chang L., Chiang Y., Tolstoshev P., Greenblatt J.J., Rosenberg S.A., Klein H., Berger M., Mullen C.A., Ramsey W.J., Muul L., Morgan R.A., Anderson W.F. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 270, 475–480.
- 2. Anguela X.M., High K.A. (2019) Entering the modern era of gene therapy. *Annu. Rev. Med.* **70**, 273–288.
- Pahle J., Walther W. (2016) Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 16, 443–461.
- Das S.K., Menezes M.E., Bhatia S., Wang X.Y., Emdad L., Sarkar D., Fisher P.B. (2015) Gene therapies for cancer: strategies, challenges and successes. *J. Cell. Physiol.* 230, 259–271.
- Malekshah O.M., Chen X., Nomani A., Sarkar S., Hatefi A. (2016) Enzyme/prodrug systems for cancer gene therapy. *Curr. Pharmacol. Rep.* 2, 299–308.
- 6. Dorer D.E., Nettelbeck D.M. (2009) Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 554–571.
- Fujiwara T., Urata Y., Tanaka N. (2007) Telomerasespecific oncolytic virotherapy for human cancer with the hTERT promoter. *Curr. Cancer Drug Targets* 7, 191–201.
- 8. Narayanan D., Ma S., Özcelik D. (2020) Targeting the redox landscape in cancer therapy. *Cancers*. 12.
- 9. Purohit V., Simeone D.M., Lyssiotis C.A. (2019) Metabolic regulation of redox balance in cancer. *Cancers.* 11.
- Leinonen H.M., Ruotsalainen A.K., Maatta A.M., Laitinen H.M., Kuosmanen S.M., Kansanen E., Pikkarainen J.T., Lappalainen J.P., Samaranayake H., Lesch H.P., Kaikkonen M.U., Yla-Herttuala S., Levonen A.L. (2012) Oxidative stress-regulated lentiviral TK/GCV gene therapy for lung cancer treatment. *Cancer Res.* 72, 6227–6235.
- Kalinichenko S.V., Shepelev M.V., Vikhreva P.N., Korobko I.V. (2017) A novel hybrid promoter ARE-hTERT for cancer gene therapy. *Acta Naturae*. 9, 66–73.
- Javan B., Shahbazi M. (2017) Hypoxia-inducible tumour-specific promoters as a dual-targeting transcriptional regulation system for cancer gene therapy. *Ecancermedicalscience* 11, 751. https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.751
- 13. Semenza G.L. (2002) HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.* **8**, 02317–02311.
- Dachs G.U., Patterson A.V., Firth J.D., Ratcliffe P.J., Townsend K.M., Stratford I.J., Harris A.L. (1997) Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat. Med.* 3, 515–520.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

- Hsiao H.T., Xing L., Deng X., Sun X., Ling C.C., Li G.C. (2014) Hypoxia-targeted triple suicide gene therapy radiosensitizes human colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.* 32, 723–729.
- Gomes E.M., Rodrigues M.S., Phadke A.P., Butcher L.D., Starling C., Chen S., Chang D., Hernandez-Alcoceba R., Newman J.T., Stone M.J., Tong A.W. (2009) Antitumor activity of an oncolytic adenoviral-CD40 ligand (CD154) transgene construct in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 15, 1317–1325.
- Hernandez-Alcoceba R., Pihalja M., Qian D., Clarke M.F. (2002) New oncolytic adenoviruses with hypoxia- and estrogen receptor-regulated replication. *Hum. Gene The.* 13, 1737–1750.
- Gao Y., Zhu Y., Huang X., Ai K., Zheng Q., Yuan Z. (2015) Gene therapy targeting hepatocellular carcinoma by a dual-regulated oncolytic adenovirus harboring the focal adhesion kinase shRNA. *Int. J. Oncol.* 47, 668–678.
- 19. Zhu W., Zhang H., Shi Y., Song M., Zhu B., Wei L. (2013) Oncolytic adenovirus encoding tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) inhibits the growth and metastasis of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* 14, 1016–1023.
- Wang X., Su C., Cao H., Li K., Chen J., Jiang L., Zhang Q., Wu X., Jia X., Liu Y., Wang W., Liu X., Wu M., Qian Q. (2008) A novel triple-regulated oncolytic adenovirus carrying p53 gene exerts potent antitumor efficacy on common human solid cancers. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1598–1603.
- Xie M., Niu J.H., Chang Y., Qian Q.J., Wu H.P., Li L.F., Zhang Y., Li J.L., Huang X.J., Ruan G.R. (2009) A novel triple-regulated oncolytic adenovirus carrying *PDCD5* gene exerts potent antitumor efficacy on common human leukemic cell lines. *Apoptosis.* 14, 1086– 1094.
- Zhao H.C., Zhang Q., Yang Y., Lu M.Q., Li H., Xu C., Chen G.H. (2007) p53-expressing conditionally replicative adenovirus CNHK500-p53 against hepatocellular carcinoma in vitro. *World J. Gastroenterol.* 13, 683–691.
- 23. Shepelev M.V., Kopantzev E.P., Vinogradova T.V., Sverdlov E.D., Korobko I.V. (2016) hTERT and BIRC5 gene promoters for cancer gene therapy: a comparative study. *Oncol. Lett.* **12**, 1204–1210.
- Shepelev M.V., Korobko E.V., Georgiev G.P., Sverdlov E.D., Korobko I.V. (2011) Application of mRNA regulatory regions to improve tumor specificity of transgene expression. *Cancer Gene Ther.* 18, 682–684.
- Marignol L., Lawler M., Coffey M., Hollywood D. (2005) Achieving hypoxia-inducible gene expression in tumors. *Cancer Biol. Ther* 4, 359–364.
- Gao S., Zhou J., Zhao Y., Toselli P., Li W. (2013) Hypoxia-response element (HRE)-directed transcriptional regulation of the rat lysyl oxidase gene in response to cobalt and cadmium. *Toxicol. Sci.* 132, 379–389.
- 27. Cowen R.L., Williams K.J., Chinje E.C., Jaffar M., Sheppard F.C., Telfer B.A., Wind N.S., Stratford I.J. (2004) Hypoxia targeted gene therapy to increase the efficacy of tirapazamine as an adjuvant to radiotherapy:

reversing tumor radioresistance and effecting cure. *Cancer Res.* 64, 1396–1402.

- Munoz-Sanchez J., Chanez-Cardenas M.E. (2019) The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J. Appl. Toxicol.* 39, 556–570.
- 29. Gu J., Fang B. (2003) Telomerase promoter-driven cancer gene therapy. *Cancer Biol. Ther.* **2**, S64–70.
- Hurttila H., Koponen J.K., Kansanen E., Jyrkkänen H.K., Kivelä A., Kylätie R., Ylä-Herttuala S., Levonen A.L. (2008) Oxidative stress-inducible lentiviral vectors for gene therapy. *Gene Ther.* 15, 1271–1279.
- Nishi H., Nakada T., Kyo S., Inoue M., Shay J.W., Isaka K. (2004) Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol.Cell. Biol.* 24, 6076–6083.
- Yuan X., Larsson C., Xu D. (2019) Mechanisms underlying the activation of TERT transcription and telomerase activity in human cancer: old actors and new players. *Oncogene.* 38, 6172–6183.
- Cheng M.Y., Lee I.P., Jin M., Sun G., Zhao H., Steinberg G.K., Sapolsky R.M. (2011) An insult-inducible vector system activated by hypoxia and oxidative stress for neuronal gene therapy. *Transl. Stroke Res.* 2, 92–100.

# COMBINATION OF ARE AND HRE *cis*-REGULATORY ELEMENTS ELEVATES THE ACTIVITY OF TUMOR-SPECIFIC **hTERT** PROMOTER

S. V. Kalinichenko<sup>1</sup>, I. V. Korobko<sup>1</sup>, and M. V. Shepelev<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia <sup>2</sup> Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia \*e-mail: mshepeley@mail.ru

*Cis*-regulatory genetic elements HRE (hypoxia response element) and ARE (antioxidant response elements) mediate activation of gene transcription in the response to hypoxia and oxidative stress, respectively. Most solid tumors are characterized by intrinsic hypoxia and oxidative stress. On the basis of these features HREs and AREs are used in genetic constructs for cancer gene therapy to provide tumor-specific therapeutic transgene expression or replication of oncolytic viruses. In this work on the basis of hTERT tumor-specific promoter we have constructed hybrid promoters carrying the combinations of HRE and ARE elements. We showed that in human lung cancer cell lines hybrid promoters HRE-ARE-hTERT and ARE-HRE-hTERT were more active compared to promoters carrying ARE or HRE only, both under basal conditions or upon imitation of hypoxia. Using cancer suicide gene therapy *in vitro* with CD:UPRT /5-FC enzyme-prodrug system as a model we showed an enhancement of cytotoxic effect on human lung cancer cells upon imitation of HRE-hTERT promoter compared to HRE-hTERT and ARE-hTERT promoters. Novel hybrid promoter HRE-ARE-hTERT could be exploited for transcriptional targeting of the therapeutic transgene expression or oncolytic virus replication upon development of novel cancer gene therapeutics.

**Keywords:** HRE (hypoxia response element), ARE (antioxidant response element), hTERT promoter, cancer gene therapy, hypoxia, oxidative stress

# ——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 577.612

# САЙЛЕНСИНГ ГЕНА *МUC4* ИНГИБИРУЕТ TGF-**β1-ИНДУЦИРОВАННЫЙ** ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ NCI-H292 РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА ЧЕЛОВЕКА ЧЕРЕЗ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ ERK1/2<sup>1</sup>

© 2021 г. Ү.-D. Кіт<sup>а, b</sup>, Ү. S. Choi<sup>a</sup>, Н. G. Na<sup>a</sup>, S.-Y. Song<sup>a</sup>, С. H. Bae<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, 42415 Republic of Korea

<sup>b</sup>Regional Center for Respiratory Diseases, Yeungnam University Medical Center, Daegu, 42415 Republic of Korea

\*e-mail: baich@med.yu.ac.kr Поступила в редакцию 01.07.2020 г. После доработки 17.08.2020 г. Принята к публикации 19.08.2020 г.

MUC4, превалирующий мембрансвязанный муцин, защищает эпителиальную поверхность и играет важную роль в процессах обновления и дифференцировки эпителиальных клеток, передаче сигналов, адгезии клеток и канцерогенезе. Недавно показано, что экспрессия MUC4 регулирует эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) раковых клеток яичников, поджелудочной железы и легких. Однако влияние экспрессии МИС4 на ЭМП в эпителиальных клетках дыхательных путей человека еще недостаточно хорошо изучено. Нами исследовано влияние индуцированной транс-формирующим фактором роста бета-1 (TGF-β1) экспрессии *MUC4* на ЭМП и оценено ее влияние на нижележащий сигнальный каскад в эпителиальных клетках респираторного тракта человека NCI-H292. Выявлено, что TGF- $\beta$ 1 индуцирует экспрессию генов MUC4, CDH2, VIM и SNAI1 и кодируемых ими белков: *MUC4*, N-кадгерина, виментина и Snail – и снижает уровень *CDH1* и его пролукта — Е-калгерина. В клетках с ноклауном *MUC4* пол лействием TGF-B1 наблюлали супрессию экспрессии генов MUC4, CDH2, VIM и SNAI1 и соответствующих белков, но не CDH1 и соответственно Е-кадгерина. Кроме того, в этих клетках обнаружили супрессию индуцируемого TGF-β1 фосфорилирования регулируемой внеклеточными сигналами киназы ERK1/2, но не Smad2/3, Akt и р38. Таким образом, сайленсинг MUC4 ингибирует TGF-β1-индуцированный ЭМП через сигнальный путь ERK1/2, из чего можно предполагать участие MUC4 в индукции ЭМП в эпителиальных клетках дыхательных путей человека.

**Ключевые слова:** *MUC4*, TGF-β1, эпителиально-мезенхимальный переход, ERK1/2, эпителиальные клетки респираторного тракта человека

DOI: 10.31857/S0026898421040078

Муцины представляют собой высокомолекулярные гликопротеины, которые можно разделить на подсемейства секреторных и связанных с мембраной [1]. МUC4 — это доминирующий мембрансвязанный муцин, находящийся на апикальной поверхности эпителия [2]. МUC4 состоит из внеклеточной  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи, содержащей трансмембранный домен и цитоплазматический хвост. МUC4 экспрессируется в эпителиальных клетках кишечника, респираторного тракта и мочеполовых путей, а также в слюнных и слезных железах [3, 4]. МUC4, прежде всего, выполняет роль "смазки" и протектора эпителиальных клеток от инфекций и поврежде-

617

ний. Кроме того, он вовлечен в дифференцировку и обновление эпителиальных клеток, клеточную адгезию, передачу сигналов между клетками и канцерогенез [5, 6].

Процесс превращения эпителиальных клеток в мезенхимальные стволовые клетки известен как эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и включает согласованные молекулярные и клеточные изменения, такие как диссоциация плотных контактов и потеря апикально-базолатеральной полярности в эпителиальных клетках [7]. Во время ЭМП уровень эпителиальных маркеров, таких как клаудин, Е-кадгерин, окклюдин и десмоплакин, снижается, в то время как мезенхимальных маркеров, таких как фибронектин, виментин, N-кадгерин и Snail, со временем индуци-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Статья представлена авторами на английском языке.

руется. Эти процессы сопровождаются такими изменениями морфологии клеток, которые характерны как при развитии, так и при инвазии раковых клеток, в том числе поджелудочной железы, яичников, молочной железы и легких [5, 7]. Следовательно, можно предположить, что экспрессия *MUC4* вовлечена в индукцию ЭМП и в эпителиальных клетках респираторного тракта человека.

Семейство трансформирующего фактора роста бета (TGF-B) состоит из трех изоформ, которые регулируют различные процессы при развитии нормальных эпителиальных клеток: пролиферацию, дифференцировку, миграцию и образование внеклеточного матрикса [8, 9]. Сигналинг TGF-β также участвует в поддержании гомеостаза тканей и обеспечении выполнения клетками своих функций [10, 11]. TGF-β1, член семейства TGF-β, представляет собой многофункциональный фактор роста, который регулирует многие биологические процессы, включая индукцию ЭМП и канцерогенез [9, 11]. Недавно показано, что экспрессия MUC4 регулирует ЭМП в клетках рака яичников, полжелудочной железы, молочной железы, шейки матки и легких. хотя при различных вилах рака роль MUC4 в индукции ЭМП различается. Во время ЭМП в раковых клетках проявляются различные характерные особенности, изменяющие межклеточные взаимодействия и взаимодействия клеток с матриксом, способствуя процессам инвазии и метастазирования [12, 13]. Однако влияние экспрессии *MUC4* на ЭМП в эпителиальных клетках дыхательных путей человека пока не изучено.

Таким образом, цель исследования состояла в выяснении возможного участия MUC4 в индукцию ЭМП в обработанных TGF-β1 эпителиальных клетках респираторного тракта человека. В работе изучено влияние сайленсинга гена *MUC4* на TGF-β1-индуцированный ЭМП и нижележащий сигнальный каскад в клетках NCI-H292.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использован рекомбинантный белок человека TGF-β1 (240-В-002), приобретенный у компании "R&D Systems, Inc." (США); эпителиальные клетки респираторного тракта человека NCI-H292 из Американской коллекции типовых культур (АТСС; American Type Culture Collection, США), фетальная сыворотка крупного рогатого скота (FBS) и BSA ("Hyclone Laboratories, Inc.", США); TRIzol и среда Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ("Life Technologies", США).

Для анализа жизнеспособности клеток колориметрическим методом с водорастворимой солью тетразолия (WST-1) использован набор EZ- Cytox Cell Viability Assay Kit (EZ-1000), приобретенный у "Daeil Lab Service Co. Ltd" (Корея).

При проведении ПЦР, ПЦР в реальном времени и обратной транскрипции использованы наборы компаний "Bio-Rad Laboratories" (США) и "Thermo Fisher Scientific" (США) соответственно.

В иммуноферментном анализе (ИФА) в качестве первичных использованы моноклональные мышиные антитела против MUC4 (ab-60720; "Abcam", Великобритания); против Е-кадгерина (3195), N-кадгерина (13116), виментина (5741) и Snail (3879) фирмы "Cell Signaling Technology" (США); в качестве вторичных – конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) козьи антитела против IgG мыши (sc-2005; "Santa Cruz Biotechnology", США).

Для иммуноблотинга в качестве первичных использованы моноклональные кроличьи антитела к Smad2/3 (8685), фосфо-Smad2/3 (8828), Akt (9272), фосфо-Akt (9271), регулируемой внеклеточными сигналами киназе 1/2 (ERK1/2) (9102), фосфо-ERK1/2 (9101) и p38 (9212) и фосфо-p38 (9211) фирмы "Cell Signaling Technology"; в качестве вторичных – HRP-конъюгированные ослиные антитела против кроличьего IgG (NB7185; "Novus Biologicals", США).

Для трансфекции клеток использованы малые интерферирующие РНК (siPHK): к гену *MUC4* (s9071) и контрольная, — Lipofectamine 2000 и культуральная среда Opti-MEM<sup>TM</sup> I с пониженным содержанием сыворотки ("Thermo Fisher Scientific").

Культивирование клеток, обработка TGF-81 и оценка жизнеспособности. Эпителиальные клетки респираторного тракта человека линии NCI-H292 культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, 1% (v/v) раствора пенициллина (10000 ед./мл) и 1% (v/v) раствора стрептомицина (10 мг/мл) при 37°С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% СО<sub>2</sub>. После достижения 80-90%-ной конфлюентности клетки инкубировали в бессывороточной среде в течение суток. После этого клетки промывали фосфатным буфером и обрабатывали TGF-β1 (5 нг/мл), растворенным в бессывороточной среде. Контрольные клетки инкубировали только с культуральной средой в течение того же времени. Жизнеспособность клеток определяли количественно с использованием набора EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit для проведения анализа с WST-1. Все эксперименты проведены в трех повторах.

ПЦР в реальном времени и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора iQ SYBR Green Supermix ("Bio-Rad Laboratories, Inc."), а для ОТ-ПЦР использовали набор GeneAmp RNA PCR Core ("Thermo Fisher Scientific") в соответствии с рекомендациями производителей. Подбор последовательностей праймеров, условий амплификации и представление результатов проводили по ранее опубликованным методикам для оценки экспрессии генов *MUC4*, *CDH1*, *CDH2*, *VIM* и *SNAI1*, кодирующих белки MUC4, Е-кадгерин, N-кадгерин, виментин и Snail [14, 15].

При проведении ПЦР в реальном времени значения экспрессии, полученные для целевого гена, были нормализованы к экспрессии гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*). Кривые плавления использовали для оценки специфичности амплификации. Рассчитывали среднее значение трех повторов для каждого образца и выражали как порог цикла ( $C_T$ ). Уровень экспрессии гена рассчитывали как разницу ( $\Delta C_T$ ) между значением  $C_T$  для целевого гена и значением  $C_T$  для целевого гена и значением РНК целевого гена определяли согласно инструкциям производителя ("Bio-Rad Laboratories, Inc.").

При проведении ОТ-ПЦР полуколичественный анализ продукта реакции выполняли на сканированных изображениях геля, при этом интенсивность полос оценивали с использованием коммерчески доступного программного обеспечения для визуализации ("Scion, Frederick", США). Относительную интенсивность отдельных полос на изображении геля определяли по соотношению интенсивности целевого гена к интенсивности *GAPDH*.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Лизаты клеток и супернатанты получали из клеток NCI-H292 эпителия респираторного тракта человека. ИФА проводили по ранее опубликованной методике для оценки уровня белка MUC4 [15]. Вкратце так. Образцы разбавляли фосфатно-солевым буфером (PBS) и переносили в 96-луночные планшеты F96 Cert. Maxisorp Nunc-Immunoplate ("Fisher Scientific", США) и инкубировали при 4°С в течение ночи. Затем образцы блокировали 2%-ным BSA в течение 1 ч и инкубировали с моноклональными мышиными антителами против MUC4 (разведение 1 : 200 в PBS с 0.05% Tween 20) в течение 1 ч. Затем образцы инкубировали с HRP-конъюгированными козьими антителами против мышиного IgG (разведение 1 : 5000 в PBS с 0.05% Твин 20) в течение 1 ч. ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) использовали в качестве субстрата HRP, и реакцию останавливали 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере EL800 ("BIO-TEK Instruments", США) при 450 нм. Результаты выражали как кратное изменение по сравнению со значением для не обработанных 

**Иммуноблотинг**. Образовавшие монослой клетки NCI-H292 обрабатывали TGF-β1 (5 нг/мл) отдельно или совместно с siPHK *MUC4*. Клетки лизировали в буфере для лизиса (30 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 5 мМ EDTA, 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 1 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеаз), центрифугировали при 2500 g в течение 10 мин, супернатант собирали и оценивали в нем концентрацию белка. Образцы, содержащие 20 мкг белка, анализировали электрофорезом в 10%-ном ПААГ-SDS, после чего проводили перенос на поливинилидендифторидную (PVDF) мембрану. Мембрану блокировали в буфере 20 мМ Трис-HCl, pH 7.6, 135 мМ NaCl, содержащем 0.1% Tween 20 и 5% BSA, а затем инкубировали с первичными антителами в течение 4 ч при комнатной температуре с последующей инкубацией со вторичными антителами в течение 1 ч. Сигналы, соответствующие исследуемым белкам, детектировали с использованием усиленного хемилюминесцентного субстрата West Pico ("Thermo Fisher Scientific") и системы визуализации хемилюминесценции FUSION FX7 ("Vilber Lourmat", Франция). В качестве положительного контроля использовали β-актин, который добавляли в каждый образец. Результаты рассчитывали в виде кратного изменения по отношению к не обработанному TGF-<sup>β</sup>1 контролю.

Трансфекция клеток siPHK. Для трансфекции клеток NCI-H292 использовали следующие последовательности siPHK к *MUC4*: смысловая – 5'-GUCGUGUGAUUGAAGCCUATT-3' и антисмысловая – 5'-UAGGCUUCAAUCACACGACCA-3'. Показано, что эффективность трансфекции siPHK МИС4 составляет более 80%. Трансфекцию проводили в соответствии с протоколом производителя ("Thermo Fisher Scientific"). Вкратце так. Клетки высевали в 6-луночный планшет из расчета 1 × × 10<sup>5</sup> клеток/лунку и инкубировали в течение ночи в среде RPMI 1640, не содержащей антибиотики. На следующий день, при достижении 80-90%-ной конфлюэнтности, клетки промывали PBS, вносили среду Opti-MEM<sup>TM</sup> I с пониженным содержанием сыворотки и комплекс siPHK с Lipofectamine 2000 в той же среде (предварительно siPHK MUC4 инкубировали с Lipofectamine 2000 в среде Opti-MEM<sup>TM</sup> I с пониженным содержанием сыворотки в течение 20 мин при комнатной температуре) в расчете, что конечная концентрация siPHK составляет 100 нМ. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°С в СО<sub>2</sub>-инкубаторе. Через 4 ч среду, содержащую комплекс siPHK *МИС4*-липофектамин. заменяли на RPMI 1640 без потери трансфекционной активности. Через 24 ч трансфекции siPHK MUC4 к клеткам добавляли TGF-β1 (5 нг/мл). Эту же процедуру выполняли с контрольной siPHK.

Статистический анализ. Экспериментальные данные анализировали с помощью SPSS версии 13.0 (SPSS, США). Все экспериментальные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение по результатам трех независимых экспериментов. Сравнение данных проводили с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента или одностороннего дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса с последующим расчетом критерия Манна–Уитни. Для всех тестов значение p < 0.05 считалось статистически значимым.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Анализ жизнеспособности клеток

В результате предварительно проведенного WST-1-анализа влияния TGF-β1 в концентрациях 0, 2 и 5 нг/мл на жизнеспособность эпителиальных клеток респираторного тракта человека NCI-H292 мы выяснили, что обработка клеток TGF-β1 в концентрации 5 нг/мл в течение 24 ч не изменяет их жизнеспособность (*данные не представлены*).

#### ТGF-*β1 индуцирует ЭМП и экспрессию МUC4*

При исследовании влияния TGF- $\beta$ 1 на ЭМП и экспрессию *MUC4* клетки линии NCI-H292 обрабатывали TGF- $\beta$ 1 (5 нг/мл) в течение 4, 24 и 48 ч. Результаты ОТ-ПЦР, ПЦР в реальном времени и ИФА показали, что TGF- $\beta$ 1 эффективно индуцировал экспрессию мРНК и белка MUC4 (рис. 1*a*, *б*). Кроме того, обработка клеток TGF- $\beta$ 1 приводила к повышению уровней мРНК N-кадгерина, виментина и Snail и к снижению мРНК Е-кадгерина (рис. 1*в*). Аналогичным образом по результатам иммуноблоттинга видно, что обработка клеток TGF- $\beta$ 1 приводила к значительному повышению уровней белков MUC4, N-кадгерина, виментина и Snail и к сильному снижению Е-кадгерина (рис. 1*г*).

## siPHK MUC4 ингибирует TGF-β1-индуцированный ЭМП в клетках NCI-H292

Чтобы исследовать влияние сайленсинга MUC4 на TGF- $\beta$ 1-индуцированный ЭМП, клетки трансфицировали siPHK к MUC4, а затем обрабатывали TGF- $\beta$ 1 (5 нг/мл) в течение 4, 24, 48 и 96 ч. По результатам ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени выявлено, что трансфекция siPHK MUC4 сопровождалась значительным ингибированием TGF- $\beta$ 1-индуцированной экспрессии мPHK MUC4, N-кадгерина, виментина и Snail и повышением снижаемого под действием TGF- $\beta$ 1 уровня мPHK E-кадгерина (рис. 2*a*, *б*).

Методом иммуноблоттинга показано, что экспрессия белков MUC4, N-кадгерина, виментина и Snail, индуцируемая TGF- $\beta$ 1, значимо снижалась, а E-кадгерина повышалась в клетках NCI-H292, трансфицированных siPHK *MUC4* (рис. 2 $\beta$ ).

По результатам микроскопии клетки NCI-H292, достигшие конфлюентности, имели булыжникообразную морфологию. После обработки TGF-β1 клетки принимали удлиненную форму – что считается характерным морфологическим фенотипом ЭМП. В клетках с нокдауном *MUC4* морфология клеток восстанавливалась от изменений, индуцированных TGF-β1 (рис. 2*г*).

### siPHK MUC4 супрессирует индуцированное TGF-β1 фосфорилирование ERK1/2

С целью исследовать участие Smad2/3, Akt, ERK1/2 и p38 в механизме опосредованной MUC4 супрессии TGF- $\beta$ 1-индуцированного ЭМП клетки NCI-H292 трансфицировали siPHK *MUC4* и инкубировали с TGF- $\beta$ 1 (5 нг/мл) в течение 2 ч, после чего исследовали фосфорилирование этих киназ. В результате проведенного иммуноблоттинга в лизатах клеток выявлено значительное повышение уровня фосфорилирования Smad2/3, Akt, ERK1/2 и p38 под действием TGF- $\beta$ 1. В клетках с нокдауном *MUC4*, обработанных TGF- $\beta$ 1, повышенные уровни фосфорилирования Smad2/3, Akt и p38 сохранялись, в то время как степень фосфорилирования ERK1/2 была снижена (рис. 3*a*, *б*).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ген, кодирующий MUC4, расположен в хромосомном локусе 3q29 и экспрессируется в норме во многих эпителиальных клетках, таких как клетки конъюнктивы, слюнной и молочной желез, трахеи, бронхов, легких, тонкой и толстой кишки, матки и влагалища. Кроме того, МИС4 экспрессируется при некоторых воспалительных заболеваниях: болезни Крона, хроническом панкреатите и астме, - а также вовлечен в развитие различных видов рака: поджелудочной железы, яичников, молочной железы и легкого [5, 16]. MUC4 выполняет различные биологические функции: участвует в обновлении и дифференцировке эпителиальных клеток, передаче клеточных сигналов, клеточной алгезии и канцерогенезе, а также выполняет роль смазки и протектора клеток эпителия [4, 5].

Сообщения о роли MUC4 в ЭМП и канцерогенезе противоречивы: в одних MUC4 участвует в подавлении, в других в индукции ЭМП в раковых клетках человека [7, 12, 17–19]. Так, сообщалось, что MUC4 индуцирует ЭМП и канцерогенез: через сигнальный путь киназы фокальных контактов усиливает экспрессию N-кадгерина, который индуцирует ЭМП и регулирует инвазивность, рост и метастатический потенциал клеток рака яичников [7]. Сверхэкспрессия *MUC4* при раке поджелудочной железы индуцирует ЭМП, что приводит к усилению инвазии и метастазирования за счет стабилизации рецептора 1 фактора роста фибробластов, вызванной активацией N-кадгерина [17]. Более того, экспрессия МИС4 вызывает значительные изменения в экспрессии мезенхимальных и эпителиальных маркеров клеток рака



**Рис. 1.** ТGF- $\beta$ 1 индуцирует ЭМП и экспрессию *MUC4* в эпителиальных клетках респираторного тракта человека NCI-H292. Влияние обработки TGF- $\beta$ 1 на экспрессию мPHK (*a*) и белка MUC4 (*b*) в клетках NCI-H292. Влияние обработки TGF- $\beta$ 1 на экспрессию мPHK N-кадгерина, виментина, Snail и Е-кадгерина (*b*) и соответствующих белков (*c*) в клетках NCI-H292. Приведенные данные представляют собой средние значения ± SD, рассчитанные по результатам трех независимых экспериментов, выполненных в трех повторах. \**p* < 0.05 по сравнению с не обработанным TGF- $\beta$ 1 контролем.

легкого: фенотип ЭМП и дифференциальная экспрессия N-кадгерина коррелируют со сверхэкспрессией и нокдауном *MUC4* в клетках рака легкого A549 [12] и экспрессия *MUC4* влияет на адгезию клеток, межклеточные контакты, гликозилирование и передачу сигналов, что связано с более низкой общей выживаемостью при плоскоклеточной аденокарциноме легкого [20]. Таким образом, в проведенном нами исследовании проанализирована ассоциация экспрессии *MUC4* с ЭМП в эпителиальных клетках респираторного тракта человека. Показано, что TGF-β1 индуцирует экспрессию MUC4, N-кадгерина, виментина и Snail, но снижает экспрессию Е-кадгерина в клетках NCI-H292. Кроме того, при нокдауне *MUC4* с помощью siPHK *MUC4* TGF-β1-



**Рис. 2.** siPHK *MUC4* подавляет TGF- $\beta$ 1-индуцированный ЭМП и экспрессию *MUC4* в клетках NCI-H292. Влияние трансфекции siPHK *MUC4* на индуцируемую обработкой TGF- $\beta$ 1 экспрессию мPHK MUC4 (*a*), N-кадгерина, виментина и Snail, а также супрессируемую TGF- $\beta$ 1 экспрессию Е-кадгерина (*b*). Анализ лизатов клеток NCI-H292, обработанных TGF- $\beta$ 1 и трансфицированных siPHK *MUC4*, методом иммуноблоттинга (*b*). Морфологический анализ клеток NCI-H29 (*c*), достигших конфлюентности (булыжникообразная форма) через 96 ч, и тех же клеток, культивированных в присутствии TGF- $\beta$ 1 (удлиненная форма, характерная для ЭМП-фенотипа) и трансфицированных siPHK *MUC4* (восстановление булыжникообразной формы). Масштаб – 100 мкм. Данные представлены как среднее ± SD на основании трех независимых экспериментов, выполненных в трех повторах. \**p* < 0.05 по сравнению с контрольной siPHK. †*p* < 0.05 по сравнению с TGF- $\beta$ 1 (5 нг/мл) + контрольная siPHK (siPHK-Con).



**Рис. 3.** siPHK *MUC4* супрессирует индуцированное TGF- $\beta$ 1 фосфорилирование ERK1/2, но не Smad2/3, Akt и p38 в клетках NCI-H292. Анализ лизатов клеток методом иммуноблотинга с использованием антител к фосфорилированным (p) белкам: p-Smad2/3 (a), p-Akt, p-ERK1/2 и p-p38 (б). Данные представлены как среднее ± SD на основании трех независимых экспериментов, выполненных в трех повторах. \*p < 0.05 по сравнению с контрольной siPHK (siPHK-Con); †p < 0.05 по сравнению с TGF- $\beta$ 1 (5 нг/мл) + siPHK-Con.

индуцированная экспрессия MUC4, N-кадгерина, виментина и Snail была супрессирована, но индуцирована подавляемая TGF- $\beta$ 1 экспрессия Е-кадгерина. В клетках NCI-H292, обработанных TGF- $\beta$ 1, с нокдауном *MUC4* морфология восстанавливалась до нормальной в результате изменения TGF- $\beta$ 1-индуцированного морфологического ЭМП-фенотипа. На основании полученных результатов можно предполагать вовлечение MUC4 в TGF- $\beta$ 1-индуцированный ЭМП в эпителиальных клетках респираторного тракта человека.

Экспрессия MUC4 регулируется многими патофизиологическими медиаторами, такими как регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе, инсулиноподобные факторы роста, интерлейкин-4, интерлейкин-9, эластаза нейтрофилов, интерферон гамма, ретиноевая кислота, а также TGF-β1 [6, 21]. Среди этих факторов TGF-β1 индуцирует экспрессию MUC4 путем активации нескольких сигнальных путей: фосфоинозитид-3-киназы (РІЗК), сигнальных каскадов протеинкиназы А, митогенактивируемой протеинкиназы (МАРК) и Smad. В раковых клетках сверхэкспрессия МИС4 снижает апоптоз и индуцирует ЭМП, вызывает их пролиферацию, инвазию и метастазирование через различные нижестоящие сигнальные пути: Raf, Ras, MAPK,

фосфолипазы C, Akt, Smad, сигнального трансдуктора и активатора транскрипции (STAT), Rho и PI3K [5, 21].

Наше исследование было сосредоточено на выяснении роли сигнальных путей Smad2/3, Akt, ERK1/2 и p38 при TGF-β1-индуцированном ЭМП и экспрессии *MUC4* в клетках NCI-H292. Показано, что в клетках NCI-H292 нокдаун *MUC4* с помощью siPHK *MUC4* не супрессирует индуцированное TGF-β1 фосфорилирование Smad2/3, Akt и p38, но подавляет индуцированное TGF-β1 фосфорилирование ERK1/2. Таким образом, экспрессия *MUC4* может играть определенную роль в TGF-β1-индуцированном ЭМП за счет модуляции сигнального пути ERK1/2.

Однако при интерпретации результатов необходимо учитывать некоторые ограничения. Во-первых, нами исследовано всего несколько маркеров ЭМП, причем на единственной линии эпителиальных клеток человека. Во-вторых, проанализирована лишь небольшая часть сигнальных путей, регулируемых MUC4 при TGF-β1-индуцированном ЭМП, причем с использованием только одной технологии – PHK-интерференции. Следовательно, полученной информации недостаточно для полного понимания влияния сайленсинга *MUC4* на TGFβ1-индуцированный ЭМП. Эти ограничения будут сняты в последующих экспериментах, в которых будут исследованы различные маркеры ЭМП и соответствующие сигнальные пути и расширены технологии введения нокдауна или нокаута, а также репертуар линий эпителиальных клеток человека и модельных животных.

Итак, нами показано, что в эпителиальных клетках респираторного тракта человека сайленсинг *MUC4* супрессирует TGF-β1-индуцированный ЭМП через сигнальный путь ERK1/2. В последующих исследованиях планируется проанализировать влияние экспрессии *MUC4* и вовлеченных в нее сигнальных путей на ЭМП. Результаты этого исследования предоставляют важные данные относительно возможной роли MUC4 в индукции ЭМП в эпителиальных клетках респираторного тракта человека.

Исследование поддержано исследовательским грантом 2017 Yeungnam University.

Все протоколы экспериментов были одобрены Наблюдательным советом больницы Йоннамского университета (the Yeungnam University Hospital-In-stitutional Review Board, No 2018-08-011).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ma J., Rubin B.K., Voynow J.A. (2018) Mucins, mucus, and goblet cells. *Chest.* 154, 169–176.
- Rowson-Hodel A.R., Wald J.H., Hatakeyama J., O'Neal W.K., Stonebraker J.R., VanderVorst K., Saldana M.J., Borowsky A.D., Sweeney C., Carraway K.L., 3rd. (2018) Membrane mucin Muc4 promotes blood cell association with tumor cells and mediates efficient metastasis in a mouse model of breast cancer. *Oncogene.* 37, 197–207.
- 3. Govindarajan B., Gipson I.K. (2010) Membrane-tethered mucins have multiple functions on the ocular surface. *Exp. Eye Res.* **90**, 655–663.
- 4. van Putten J.P.M., Strijbis K. (2017) Transmembrane mucins: Signaling receptors at the intersection of inflammation and cancer. *J. Innate Immun.* **9**, 281–299.
- Xia P., Choi A.H., Deng Z., Yang Y., Zhao J., Wang Y., Hardwidge P.R., Zhu G. (2017) Cell membrane-anchored MUC4 promotes tumorigenicity in epithelial carcinomas. *Oncotarget.* 8, 14147–14157.
- Kim Y.D., Bae C.H., Song S.Y., Choi Y.S. (2015) Effect of β-glucan on MUC4 and MUC5B expression in human airway epithelial cells. *Int. Forum Allergy Rhinol.* 5, 708–715.
- Ponnusamy M.P., Lakshmanan I., Jain M., Das S., Chakraborty S., Dey P., Batra S.K. (2010) MUC4 mucin-induced epithelial to mesenchymal transition: a novel mechanism for metastasis of human ovarian cancer cells. *Oncogene*. 29, 5741–5754.
- Komai T., Okamura T., Yamamoto K., Fujio K. (2016) The effects of TGF-βs on immune responses. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* (Jpn.). 39, 51–58.

- Hao Y., Baker D., Ten Dijke P. (2019) TGF-β-mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2767.
- Nakao A., Afrakhte M., Morén A., Nakayama T., Christian J.L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N.E., Heldin C.H., ten Dijke P. (1997) Identification of Smad7, a TGFβ-inducible antagonist of TGF-β signalling. *Nature.* 389, 631–635.
- Kolosova I., Nethery D., Kern J.A. (2011) Role of Smad2/3 and p38 MAP kinase in TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition of pulmonary epithelial cells. J. Cell Physiol. 226, 1248–1254.
- Ponnusamy M.P., Seshacharyulu P., Lakshmanan I., Vaz A.P., Chugh S., Batra S.K. (2013) Emerging role of mucins in epithelial to mesenchymal transition. *Curr. Cancer Drug Targets.* 13, 945–956.
- Xu D., Liu S., Zhang L., Song L. (2017) MiR-211 inhibits invasion and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of cervical cancer cells via targeting MUC4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485, 556–562.
- Matull W.R., Andreola F., Loh A., Adiguzel Z., Deheragoda M., Qureshi U., Batra S. K., Swallow D.M., Pereira S.P. (2008) MUC4 and MUC5AC are highly specific tumour-associated mucins in biliary tract cancer. *Br. J. Cancer.* 98, 1675–1681.
- Hu J., Zhou Z., Shi S., Zhu X., Wang X., Zhang W., Hu S., Qian H., Xu W. (2013) Mesenchymal stem-like cells isolated from human esophageal carcinoma and adjacent non-cancerous tissues. *Oncol. Lett.* 5, 179–184.
- Chaturvedi P., Singh A.P., Batra S.K. (2008) Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *FASEB. J.* 22, 966–981.
- Rachagani S., Macha M.A., Ponnusamy M.P., Haridas D., Kaur S., Jain M., Batra S.K. (2012) MUC4 potentiates invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through stabilization of fibroblast growth factor receptor 1. *Carcinogenesis*. 33, 1953–1964.
- Majhi P.D., Lakshmanan I., Ponnusamy M.P., Jain M., Das S., Kaur S., Shimizu S.T., West W.W., Johansson S.L., Smith L.M., Yu F., Rolle C.E., Sharma P., Carey G.B., Batra S.K., Ganti A.K. (2013) Pathobiological implications of MUC4 in non-small-cell lung cancer. J. Thorac. Oncol. 8, 398–407.
- Gao L., Liu J., Zhang B., Zhang H., Wang D., Zhang T., Liu Y., Wang C. (2014) Functional MUC4 suppress epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma metastasis. *Tumor Biol.* 35, 1335–1341.
- 20. Jonckheere N., Van Seuningen I. (2018) Integrative analysis of the cancer genome atlas and cancer cell lines encyclopedia large-scale genomic databases: MUC4/ MUC16/MUC20 signature is associated with poor survival in human carcinomas. J. Transl. Med. 16, 259.
- Reynolds I.S., Fichtner M., McNamara D.A., Kay E.W., Prehn J.H.M., Burke J.P. (2019) Mucin glycoproteins block apoptosis; promote invasion, proliferation, and migration; and cause chemoresistance through diverse pathways in epithelial cancers. *Cancer Metastasis Rev.* 38, 237–257.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

# MUC4 SILENCING INHIBITS TGF-β1-INDUCED EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION VIA THE ERK1/2 PATHWAY IN HUMAN AIRWAY EPITHELIAL NCI-H292 CELLS

Y.-D. Kim<sup>1, 2</sup>, Y. S. Choi<sup>1</sup>, H. G. Na<sup>1</sup>, S.-Y. Song<sup>1</sup>, and C. H. Bae<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, 42415 Republic of Korea

<sup>2</sup> Regional Center for Respiratory Diseases, Yeungnam University Medical Center, Daegu, 42415 Republic of Korea \*e-mail: baich@med.yu.ac.kr

MUC4 is a predominant membrane-tethered mucin lubricating and protecting the epithelial surface and playing various biological roles in the renewal and differentiation of epithelial cells, cell signaling, cell adhesion, and carcinogenesis. Interestingly, recent studies have demonstrated that MUC4 expression regulates the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells in ovarian, pancreatic, and lung cancer. However, the effects of *MUC4* expression on EMT in human airway epithelial cells are not yet well known. Here, we describe the effects of transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1)-induced *MUC4* expression on EMT and evaluate its downstream signaling pathway in human airway epithelial cells. In human airway epithelial NCI-H292 cells, exposure to TGF- $\beta$ 1 induced expression of *MUC4*, *CDH2*, *VIM* and *SNAI1* genes and encoded by them proteins, MUC4, N-cadherin, vimentin and Snail, and reduced the level of *CDH1* and its product, E-cadherin. In *MUC4*-knockdown cells, TGF- $\beta$ 1-induced expression levels of *MUC4*, *CDH2*, *VIM* and *SNAI1* and corresponding proteins were suppressed, but *CDH1* and E-cadherin levels were not. In addition, TGF- $\beta$ 1-induced phosphorylation of extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) was suppressed, but that of Smad2/3, Akt, and p38 was not. The results of this study suggest that *MUC4* silencing inhibits TGF- $\beta$ 1-induced EMT *via* the ERK1/2 pathway, and a possible role of MUC4 in the induction of EMT in human airway epithelial cells.

Keywords: MUC4, TGF- $\beta$ 1, epithelial-mesenchymal transition, ERK1/2, airway epithelial cells

# —— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 575.113.5:575.117.2

# АУТОФАГИЯ НЕ ВЛИЯЕТ НА ОТВЕТ ЛИНИИ КЛЕТОК ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА, УСТОЙЧИВОЙ К ИМАТИНИБУ, НА ИНГИБИТОРЫ ТИРЗИНКИНАЗ<sup>1</sup>

© 2021 г. S. Baykal-Köse<sup>a, \*</sup>, H. Efe<sup>b</sup>, Z. Yüce<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Izmir Biomedicine and Genome Center (IBG), Dokuz Eylul University Health Campus, Inciralti-Balcova, Izmir, 35340 Turkey <sup>b</sup>Dokuz Eylul University, Medical School, Medical Biology Department, Izmir, 35330 Turkey

> \*e-mail: seda.baykalkose@gmail.com Поступила в редакцию 30.06.2020 г. После доработки 27.08.2020 г. Принята к публикации 03.09.2020 г.

Предполагается, что аутофагия — эволюционно консервативный процесс, с помощью которого компоненты цитоплазмы поступают в лизосомы для деградации, играет роль в развитии устойчивости клеток хронического миелоидного лейкоза к иматинибу. Хронический миелоидный лейкоз — клональное миелопролиферативное заболевание, возникает в результате неопластической трансформации гемопоэтических стволовых клеток. С использованием Bcr-Abl-независимой и устойчивой к иматинибу субпопуляции клеток K562 (K562-IR), полученной нами ранее, показано, что в присутствии иматиниба аутофагия запускается посредством трансформации LC3-I/II, активации белка р62 и накопления закисленных вакуолей в клетках K562, чувствительных к ингибитору тирозинкиназ. При этом в клеточной линии K562-IR, устойчивой к иматинибу и независимой от Bcr-Abl, аутофагия не индуцируется. Это исследование проведено в связи с сочетанным применением ингибиторов тирозинкиназ и ингибиторов аутофагии. Показано, что такие комбинации могут быть неэффективными в случае хронического миелоидного лейкоза, устойчивого к ингибиторам тирозинкиназ. Это может быть связано с отсутствием активации клеточного стресса и аутофагии при обработке таких клеток ингибиторами тирозинкиназ, поскольку для выживания им не требуется передача сигналов Bcr-Abl.

**Ключевые слова:** аутофагия, хронический миелоидный лейкоз, иматиниб, ингибиторы тирозинкиназ **DOI:** 10.31857/S0026898421040042

## **ВВЕДЕНИЕ**

Изучение механизмов гибели и выживания клеток имеет решающее значение для разработки новых стратегий и терапевтических средств, применяемых при злокачественных заболеваниях. Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) – клональное миелопролиферативное заболевание, обусловленное неопластической трансформацией гемопоэтических стволовых клеток [1]. В качестве первичного генетического дефекта при ХМЛ идентифицирован химерный ген *BCR-ABL*. Этот ген расположен на филадельфийской хромосоме, а его образование связано с транслокацией t(9: 22) (q34: q11). Онкобелок Bcr-Abl. обладающий аномальной тирозинкиназной активностью, связан с чрезмерным расширением миелоидного клеточного компартмента. Онкобелок Bcr-Abl обеспечивает повышенную активацию сигналов выживания в лейкозных клетках, которые способствуют увеличению клеточной пролиферации, придают клеткам злокачественный фенотип и делают их устойчивыми к запрограммированной гибели [2]. Ингибитор тирозинкиназ – мезилат иматиниба – произвел революцию в терапии ХМЛ, поскольку подавляет активность онкобелка Bcr-Abl. Иматиниб блокирует сигналы выживания, обеспечиваемые Bcr-Abl, что в конечном итоге приводит к гибели лейкозных клеток [3]. Программируемой гибели клеток, которая обеспечивает элиминацию поврежденных или нежелательных клеток, отводится важная роль в поддержании клеточного гомеостаза. Программируемая гибель клеток осуществляется преимущественно каспазозависимым путем, известным как апоптоз. Известны еще два механизма клеточной смерти - некроз и зависимая от аутофагии гибель клеток [4]. Аутофагия это эволюционно консервативный процесс, при котором компоненты цитоплазмы доставляются в лизосомы для деградации. Известны три типа аутофагии: микроаутофагия, аутофагия, опосре-

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Статья представлена авторами на английском языке.

дованная шаперонами, и макроаутофагия, причем преобладает последняя форма (далее именуемая аутофагией) [5]. Аутофагия отвечает за деградацию белков и обновление органелл. Части цитоплазмы и органеллы заключаются в аутофагосомы – двухмембранные везикулы, локализованные в цитозоле, которые придают клеткам характерный вакуолизированный вид [6]. Иными словами, комплекс Atg1/ULK1 передает сигналы, обеспечивающие его перенос на изолирующую мембрану, инициируя образование аутофагосом [5, 7]. Формирование аутофагосом, в свою очередь, рекрутирует комплекс PI3K/PtdIns(3)K класса III (содержит белки Vps34, Vps15, Atg6 и Atg14), необходимый для продукции фосфатидилинозитол-3фосфата. После привлечения других молекул происходит сборка убиквитинподобных систем конъюгации – Atg8/LC3 и Atg12-Atg5, необходимых для удлинения и созревания аутофагосомы [8].

В дальнейшем аутофагосома сливается с лизосомой и образует аутолизосому, в которой цитозольный материал разрушается и используется в последующей рециклизации.

Аутофагия способствует выживанию клеток за счет повторного использования основных клеточных компонентов. Сначала аутофагию описывали как механизм гибели клеток. Сегодня связь между аутофагией и гибелью клеток считается более сложной, причем неясно, можно ли рассматривать аутофагию как основную причину гибели клеток. Детальное установление вклада аутофагии в гибель клеток (без участия альтернативных путей) все еще остается предметом дискуссий [5, 9]. Присутствие аутофагосом в погибающих клетках может отражать активацию компенсаторных механизмов, связанных с выживанием [10]. Вопреки ожиданиям, в определенных условиях повышенная вакуолизация может не коррелировать с усилением аутофагии, но скорее отражать дефект созревания аутофагосом, приводящий к снижению аутофагии [11].

Устойчивость к иматинибу и другим ингибиторам тирозинкиназ (ИТК) при некоторых вариантах ХМЛ представляет существенную проблему для успешной терапии опухолей, что отчасти связывают с индукцией аутофагии [12, 13]. Высказано предположение, что аутофагия, обеспечивающая выживание клеток в ответ на терапию ИТК, связана с развитием устойчивости к иматинибу. В ряде исследований отмечено увеличение гибели лейкозных клеток в ответ на применение иматиниба в комбинации с ингибиторами аутофагии [14]. Нами проведен сравнительный анализ активации индуцированной иматинибом аутофагии в чувствительных и резистентных к этому ингибитору клетках ХМЛ.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток. BCR-ABL-позитивные клетки ХМЛ человека линии К562 приобретены из коллекции клеток АТСС. Резистентный субклон K562-IR получен в нашей лаборатории с помощью клональной селекции при увеличении доз иматиниба. Начальная доза составляла 0.1 мкМ, а конечная – 10 мкМ, что в 2 раза выше концентрации в сыворотке крови пациентов, получавших иматиниб в суточной дозе 400 мг [15]. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), пенициллина G (1 ед./мл) и стрептомицина (1 мг/мл) при 37°С и 5% СО2. Клетки К562-IR непрерывно культивировали с добавлением 10 мкМ иматиниба, если не указано иное. В некоторых опытах клетки K562-IR дважды промывали PBS для элиминации препарата.

Аннексин V/исследование мембранного потенциала митохондрий. Набор Invitrogen Mitochondrial Membrane Potential/Annexin V Арорtosis Kit (#V35116, "Invitrogen", США) использовали в соответствии с инструкциями производителя. Набор содержит красители MitoTracker<sup>®</sup> Red и Alexa<sup>®</sup> Fluor 488 annexin V для проточной цитометрии ("BD FACSCanto II", "BD Biosciences", США) для определения апоптотических изменений мембранного потенциала митохондрий и клеточной мембраны.

Определение активности каспазы-3. Анализ проводили с помощью набора Sigma Fluorimetric Caspase-3 Assay Kit (#CASP3F, "Sigma-Aldrich", США) в соответствии с инструкциями производителя. Набор содержит субстрат каспазы-3, Ас-DEVD-AMC, который лизируется активной каспазой-3. Высвобождение AMC, коррелирующее с активностью каспазы-3, определяли по интенсивности флуоресценции, измеряемой с использованием флуоресцентного спектрофотометра (Biotek Synergy HT fluorescence spectrophotometer, 360/460 nm).

Вестерн-блот-анализ. Белковые лизаты получали из клеток К562, которые обрабатывали 1 мкМ иматиниба в течение 24 ч, клеток K562-IR, не обработанных иматинибом, и клеток K562-IR, обработанных иматинибом в концентрации 10 мкМ. С этой целью к осадкам клеток добавляли буфер RIPA (150 мМ NaCl, 1.5% NP-40, 0.5% дезоксихолат натрия, 0.1% SDS, 50 мМ Трис-HCl, рН 8.0; добавляли 1 мМ PMSF и ингибиторы фосфатазы и протеазы) и хранили их при температуре -80°С для дальнейшего использования. Белки анализировали количественно с помощью бицинхонинового метода (ВСА). Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и переносили на PVDF-мембраны "мокрым" способом. Мембраны обрабатывали раствором специфических антител с последующей визуализацией с использованием чувствительных рентгеновских пленок ("Carestkeam Health", США). Использовали следующие антитела: к B-актину HRP ("Sigma", A3854), к eIF4E ("Cell Signaling", США, #2067), к LC3A/B ("Cell signaling", #4108), к фосфо-mTOR ("Cell signaling", #2971), к фосфо-c-Abl (Tyr245) ("Cell signaling", #2868), к фосфо-CrkL (Tyr207) ("Cell signaling", #3181).

Количественное определение аутофагических вакуолей путем окрашивания акридиновым оранжевым. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали и инкубировали в среде, содержащей 0.5 мкг/мл акридинового оранжевого ("Invitrogen" A3568), в течение 15 мин. Акридиновый оранжевый удаляли, клетки дважды промывали и ресуспендировали в PBS. Количество клеток с низким значением pH в везикулах (AVO) определяли с помощью проточной цитометрии. Клетки анализировали с использованием BD FACSCanto II и программного обеспечения BD FACSDiva. Проанализированы не менее 20000 клеток. Все эксперименты выполнены в трех повторностях.

# РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## Клетки K562-IR не зависят от Bcr-Abl и не поддаются воздействию высоких доз иматиниба

Клетки К562-IR были получены путем клональной селекции клеток, культивируемых в присутствии иматиниба. В предыдущей работе нами показано, что такие клетки устойчивы к первым трем поколениям ИТК [16]. Перед проведением дальнейших экспериментов определили жизнеспособность и ответ на иматиниб резистентных (K562-IR) и чувствительных (К562) клеток ХМЛ после замораживания-оттаивания. Методом проточной цитометрии мы подтвердили, что иматиниб в концентрации 1 мкМ индуцирует гибель клеток К562, тогда как клетки K562-IR, непрерывно культивируемые в присутствии 10 мкМ иматиниба, были устойчивыми к этому препарату; через 72 ч жизнеспособность клеток составила 16 и 86% соответственно (рис. 1а). Активация каспазы в клетках К562, обработанных 1 мкМ иматиниба, оказалась в ~15 раз выше, чем в резистентных клетках K562-IR, обработанных 10 мкМ иматиниба в течение 72 ч (рис. 16). Была ли внутриклеточная концентрация иматиниба достаточной для ингибирования сигнального пути Bcr-Abl как в клетках К562, так и в клетках К562-IR? Чтобы определить это, нами проведен вестерн-блот-анализ фосфорилированной формы Bcr-Abl (p-Bcr-Abl) и его молекулы-мишени p-CrkL. В обеих клеточных

линиях аутофосфорилирование BCR-ABL и фосфорилирование CrkL было подавлено иматинибом, что подтверждает его активность в клетках К562 и К562-IR. Клеточная линия К562-IR в отличие от клеток К562 была устойчивой к иматинибу, несмотря на подавление сигнального пути Всг-Abl. Это означает, что Всг-Abl больше не обеспечивает активацию сигнала выживания клеток К562-IR (рис. 1*в*).

## Иматиниб не вызывает образования закисленных вакуолей в резистентных клетках ХМЛ

В ходе аутофагии возрастает закисление вакуолей, что можно обнаружить при окрашивании акридиновым оранжевым. Добавление 1 мкМ иматиниба к чувствительным клеткам K562 резко увеличивает образование закисленных вакуолей, в то время как в резистентной линии K562-IR этого не наблюдали даже после обработки 10 мкМ иматиниба в течение 72 ч (рис. 26).

#### Иматиниб не индуцирует аутофагию в резистентных клетках ХМЛ

Количество белков LC3-I/II, p62, Beclin 1 и mTOR определяли с помощью Вестерн-блотинга в чувствительных и резистентных клеточных линиях ХМЛ с иматинибом или без него. При активации аутофагии и образования фагофоры субъединица LC3-I трансформируется в LC3-II. При исследовании ингибирования аутофагии в качестве контроля использовали хлорохин, который ингибирует аутофагию, повышая рН в лизосомах, что приводит к подавлению слияния аутофагосом с лизосомами [17]. При добавлении иматиниба уровень LC3-II в клетках К562 повышается, тогда как в резистентных клетках K562-IR изменения не выявлены (рис. 2*a*). Хлорохин индуцировал трансформацию LC-I в LC-II как в чувствительных, так и в резистентных клетках независимо от иматиниба. В резистентных клетках количество белка р62 оставалось на низком уровне независимо от наличия или отсутствия иматиниба, в то время как клетки К562 содержали много р62. Изменения количества белка p62 (SOSTM1/sequestosome 1) учитываются при анализе полиубиквитинированных агрегатов белков. p62/SQSTM1 взаимодействует с полиубиквитинированными агрегатами белка через убиквитинсвязывающий домен и с LC3 через его LC3-связывающий домен, тем самым направляя их разрушение в аутолизосоме [18]. С другой стороны, количество белка Beclin1 – маркера индукции аутофагии, было сопоставимым в обеих клеточных линиях независимо от обработки иматинибом. Общий уровень белка mTOR в обеих клеточных линиях не изменялся при обработке иматинибом. Однако в резистентной клеточ-



**Рис. 1.** Клетки K562-IR, устойчивые к иматинибу и Bcr-Abl-независимые. *а* – Анализ жизнеспособности клеток K562 и K562-IR с помощью проточной цитометрии (*a*) и активация каспаз в этих клетках (*б*). Клетки K562 обрабатывали 1 мкМ иматинибом в течение 72 ч, клетки K562-IR непрерывно культивировали в присутствии 10 мкМ иматиниба. *в* – Вестерн-блот-анализ пути Bcr-Abl. Клетки K562 обрабатывали 1 мкМ иматинибом в течение 24 ч, а клетки K562-IR непрерывно культивировали е IF4E.

ной линии уровни активной формы mTOR, pmTOR Ser2448 были выше, чем в чувствительных клетках. Обработка иматинибом не влияла на уровень экспрессии mTOR и p-mTOR в обеих клеточных линиях.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Иматиниб – первый таргетный ингибитор онкобелка Всг-Abl, введение которого в клиническую практику повлияло на прогноз и лечение ХМЛ. Тем не менее, развитие устойчивости к иматинибу и другим ИТК остается нерешенной терапевтической задачей. Резистентность к ИТК может возникать в результате действия механизмов, связанных или не связанных с Всг-Abl [15, 19, 20]. Кроме того, пул лейкозных клеток, нечувствительных к ИТК, содержит лейкозные стволовые клетки, которые не зависят от Всг-Abl и способны выживать при длительной терапии ИТК [21–23]. Ранее показали, что аутофагия активируется при воздействии ИТК на клетки ХМЛ и способствует развитию лекарственной устойчивости [12]. Предположили, что применение ИТК может запускать различные сигнальные пути в лейкозных CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> стволовых клетках. Так, ингибирование BCR-ABL с помощью ИТК может вызвать гибель клеток-предшественников, но при этои индуцировать защитную аутофагию [24]. Таким образом, сочетание ИТК с ингибиторами аутофагии рассматривается в качестве новой терапевтической стратегии при ХМЛ.

Аутофагия играет цитопротективную роль, способствуя выживанию раковых клеток. Результат, к которому приводит активация аутофагии, во многом зависит от индивидуального состояния клетки. Осуществляя катаболический процессинг и удаляя поврежденные макромолекулы, аутофагия защищает протеом клетки и обеспечивает поступление строительных блоков в условиях стресса [10, 25]. Аутофагия уменьшает также повреждение ДНК, поскольку удаляет поврежденные органеллы (митохондрии и пероксисомы) с последующим снижением выработки активных форм кислорода



**Рис. 2.** Активация аутофагии в клетках K562 и K562-IR. Клетки K562 обрабатывали 1 мкМ иматиниба в течение 24 ч, а клетки K562-IR непрерывно культивировали с 10 мкМ иматиниба. Образцы без иматиниба: клетки K562-IR дважды промывали PBS и культивировали в течение 24 ч перед экспериментом. *a* – Вестерн-блот-анализ количества белков LC3-I/II. Положительный контроль ингибирования аутофагии – клетки, обработанные 50 мкМ хлорохином в течение 24 ч перед экспериментом. *b* – Окрашивание клеток K562 и K562-IR акридиновым оранжевым. *b*, *c* – Вестерн-блот-анализ уровней экспрессии p62, Beclin, mTOR и p-mTOR.

[26]. Ингибирование аутофагии в раковых клетках в сочетании с воздействием облучения и обработкой алкилирующими агентами, приводит к усиленной гибели клеток [27]. В ряде исследований показано, что химиотерапевтические агенты индуцируют в раковых клетках как апоптоз, так и аутофагию. [28]. По-видимому, аутофагию, сопутствующую гибели клеток, можно рассматривать как проявление стрессовой реакции, направленной на защиту клеток от повреждения. Аутофагосомы, обнаруженные в таких клетках, могут указывать на попытку предотвращения их гибели [9]. Иматиниб дозозависимым образом активирует аутофагию в клетках млекопитающих, независимо от вида, ткани или статуса иммортализации клеток [29]. При ХМЛ сигналы Bcr-Abl приводят к активации сигнального пути mTOR, который, как известно, ингибирует аутофагию. Кроме того, Bcr-Abl фосфорилирует Beclin-1, что приводит к подавлению аутофагии [30].

Блокирование сигнального пути Bcr-Abl иматинибом и другими ИТК ингибирует путь mTOR [31, 32] и его взаимодействие с белками аутофагии, что приводит к активации аутофагии, которая фактически обеспечивает выживание клеток в ответ на индуцированный иматинибом стресс, способствующий развитию резистентности к терапии. Кроме того, показано, что ингибитор сигнального пути mTOR, отрицательно регулирующего аутофагию, подавляет рост Bcr-Abl-позитивных клеток [33].

Индуцированная ИТК гибель лейкозных клеток может быть усилена путем целенаправленного воздействия на белки аутофагии [34-36]. Новые терапевтические стратегии, направленные на ингибирование аутофагии в клетках ХМЛ, потенциально могут усилить ИТК-индуцированную гибель лейкозных клеток. Показано, что ингибирование аутофагии с помощью гидроксихлорохина (НСQ) способствует повышению чувствительности клеток ХМЛ, включая лейкозные стволовые клетки, к ИТК. Исследование CHOICES (CHIOroquine and Imatinib Combination to Eliminate Stem cells) представляет собой рандомизированное испытание эффективности иматиниба, а также комбинации хлорохина с иматинибом при ХМЛ. Это первое клиническое испытание, направленное на иингибирование аутофагии при ХМЛ. Последние данные свидетельствуют о том, что нетоксичные концентрации ингибиторов аутофагии первого поколения в сыворотке крови некоторых пациентов не способны обеспечить

631

необходимый уровень ингибирования аутофагии, однако ингибиторы аутофагии второго поколения могут улучшить исход заболевания [14].

Однако установлены не все механизмы устойчивости к ИТК, природа устойчивости к ИТК у некоторых пациентов до сих пор неизвестна. Описанный нами терапевтический подход, заключающийся в использовании комбинации ИТК с ингибитором аутофагии, основан на предположении, что иматиниб вызывает клеточный стресс, запускающий аутофагию, которая, в свою очередь, действует в качестве реакции выживания. При активации Всг-Abl-независимых механизмов клеточного стресса описанные стратегии не будут эффективными.

В этом исследовании мы показали, что ингибирование аутофагии не влияет на жизнеспособность резистентной к ИТК "нестволовой" популяции клеток ХМЛ, полученных из клеточной линии К562. Устойчивые к ИТК клетки линии К562-IR получены методом клональной селекции под воздействием иматиниба. Эти клетки устойчивы к ИТК трех первых поколений. О биологических характеристиках этих клеток сообщалось ранее [16]. Нами показано, что иматиниб блокирует передачу сигналов Bcr-Abl как в клетках K562, так и в клетках K562-IR. Клеточная линия K562-IR устойчива к иматинибу, несмотря на ингибирование Bcr-Abl, что свидетельствует о независимости механизма резистентности от Bcr-Abl. Обработка иматинибом приводила к резкому повышению закисления вакуолей в клетках К562, в то время как в клетках K562-IR такой эффект не наблюдался. Хлорохин индуцировал увеличение количества белка LC3-II как в чувствительных, так и в резистентных клетках независимо от обработки иматинибом. Применение только иматиниба (без хлорохина) приводило к увеличению количества LC3-II в клетках K562, по сравнению с K562-IR. В резистентных клетках (независимо от наличия или отсутствия иматиниба) содержание белка p62 находилось на низком уровне, в то время как в клетках К562 - на высоком. Нами показано также, что синтез активных форм mTOR, p-mTOR Ser2448 был выше в резистентной клеточной линии. Сигнальный путь mTOR – это путь выживания, который регулируется сигналами стресса. В условиях клеточного стресса он ингибируется, что приводит к активации аутофагии, тогда как активный сигнальный путь ингибирует аутофагию, препятствуя формированию и созреванию аутофагосомы [37]. Активный сигнальный путь mTOR коррелирует с отсутствием аутофагии в клетках K562-IR. Полученные нами результаты позволяют предложить модель резистентности, согласно которой обработка клеток ИТК не усиливает аутофагию в клетках ХМЛ, так как не вызывает клеточный стресс. Мы предполагаем, что применение ИТК в комбинации с ингибиторами аутофагии при ХМЛ с Всг-Abl-независимыми механизмами резистентности к ИТК, не даст желаемого терапевтического эффекта. Выявление независимых от Всг-Abl механизмов резистентности к ИТК будет способствовать разработке новых терапевтических стратегий при ХМЛ.

Работа получили финансирование Фонда научных исследований Dokuz Eylul University (грант № 2009KBSAG29).

В работе не использовали людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Zeynep Yüce и Seda Baykal-Köse участвовали в разработке концепции и дизайна исследования. Подготовка материалов, сбор данных и анализ выполнены Seda Baykal-Köse и Hande Efe. Первый вариант рукописи написан Seda Baykal-Köse и Zeynep Yüce. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Quintás-Cardama A., Cortes J. (2009) Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood.* **113**, 1619–1630.
- Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V (2000) The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 96, 3343–3356.
- Hochhaus A., Larson R.A., Guilhot F., Radich J.P., Branford S., Hughes T.P., Baccarani M., Deininger M.W., Cervantes F., Fujihara S., Ortmann C.-E., Menssen H.D., Kantarjian H., O'Brien S.G., Druker B.J. (2017) Longterm outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 376, 917–927.
- D'Arcy M.S. (2019) Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell. Biol. Int.* 43, 582–592.
- 5. Denton D., Kumar S. (2019) Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.* **26**, 605–616.
- 6. Levine B., Kroemer G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* **132**, 27–42.
- 7. Yu L., Chen Y., Tooze S.A. (2018) Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*. 14, 207–215.
- 8. Geng J., Klionsky D.J. (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO Rep.* **9**, 859–864.
- 9. Bialik S., Dasari S.K., Kimchi A. (2018) Autophagydependent cell death – where, how and why a cell eats itself to death. *J. Cell Sci.* **131**, jcs215152.
- Shidoji Y. (2014) Geranylgeranoic acid induces incomplete autophagy but leads to the accumulation of autophagosomes in human hepatoma cells. In: *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging.* Elsevier Inc. 3, 173–185.

- 11. Kroemer G., Levine B. (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**(12), 1–17.
- Crowley L.C., O'Donovan T.R., Nyhan M.J., McKenna S.L. (2013) Pharmacological agents with inherent anti-autophagic activity improve the cytotoxicity of imatinib. *Oncol. Rep.* 29, 2261–2268.
- Shao S., Li S., Qin Y., Wang X., Yang Y., Bai H., Zhou L., Zhao C., Wang C. (2014) Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia. *Int. J. Oncol.* 44, 1661–1668.
- Mishima Y., Terui Y., Mishima Y., Taniyama A., Kuniyoshi R., Takizawa T., Kimura S., Ozawa K., Hatake K. (2008) Autophagy and autophagic cell death are next targets for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Sci.* 99, 2200–2208.
- 15. Deininger M.W.N., Druker B.J. (2003) Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol. Rev.* **55**, 401–423.
- Baykal-Köse S., Acikgoz E., Yavuz A.S., Geyik Ö.G., Ateş H., Sezerman O.U., Özsan G.H., Yüce Z. (2020) Adaptive phenotypic modulations lead to therapy resistance in chronic myeloid leukemia cells. *PLoS One*. 15(2), e0229104. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229104
- 17. Mauthe M., Orhon I., Rocchi C., Zhou X., Luhr M.,
- Hijlkema K.J., Coppes R.P., Engedal N., Mari M., Reggiori F. (2018) Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy.* 14, 1435–1455.
- 18. Barth S., Glick D., Macleod K.F. (2010) Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* **221**, 117–124.
- O'Hare T., Zabriskie M.S., Eiring A.M., Deininger M.W. (2012) Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat. Rev. Cancer.* 12, 513–526.
- Bubnoff N., Duyster J. (2010) Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch. Arztebl. Int.* 107, 114–121.
- 21. Chen Y., Li S. (2013) Molecular signatures of chronic myeloid leukemia stem cells. *Biomark. Res.* 1, 21.
- Zhang H., Li S. (2013) Molecular mechanisms for survival regulation of chronic myeloid leukemia stem cells. *Protein Cell.* 4, 186–196.
- 23. Hu Y., Li S. (2016) Survival regulation of leukemia stem cells. *Cell Mol. Life Sci.* **73**, 1039–1050.
- Calabretta B., Salomoni P. (2011) Inhibition of autophagy: A new strategy to enhance sensitivity of chronic myeloid leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk. Lymphoma.* 52, 54–59.
- 25. Shen S., Codogno P. (2016) The role of autophagy in cell death. In: *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, In-flammation, Immunity, Infection, and Aging.* Elsevier Acad. Press, 139–154.
- Auberger P., Puissant A. (2017) Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia. *Blood.* 129, 547–552.
- 27. Chen N., Karantza V. (2011) Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 157–168.

- Ricci M.S., Zong W. (2006) Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist*. 11, 342–357.
- Ertmer A., Huber V., Gilch S., Yoshimori T., Erfle V., Duyster J., Elsässer H.P., Schäzl H.M. (2007) The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia*. 21, 936–942.
- Yu C., Gorantla S.P., Müller-Rudorf A., Müller T.A., Kreutmair S., Albers C., Jakob L., Lippert L.J., Yue Z., Engelhardt M., Follo M., Zeiser R., Huber T.B., Duyster J., Illert AL (2020) Phosphorylation of BECLIN-1 by BCR-ABL suppresses autophagy in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 105, 1285–1293.
- Kharas M.G., Janes M.R., Scarfone V.M., Lilly M.B., Knight Z.A., Shokat K.M., Fruman D.A. (2008) Ablation of PI3K blocks BCR-ABL leukemogenesis in mice, and a dual PI3K/mTOR inhibitor prevents expansion of human BCR-ABL+ leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 118, 3038–3050.
- Klejman A., Rushen L., Morrione A., Slupianek A., Skorski T. (2002) Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. Oncogene. 21, 5868–5876.
- Mohi M.G., Boulton C., Gu T.L., Sternberg D.W., Neuberg D., Griffin J.D., Gilliland D.G., Neel B.G. (2004) Combination of rapamycin and protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors for the treatment of leukemias caused by oncogenic PTKs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 3130–3135
- Baquero P., Dawson A., Mukhopadhyay A., Kuntz E.M., Mitchell R., Olivares O., Ianniciello A., Scott M.T., Dunn K., Nicastri M.C., Winkler J.D., Michie A.M., Ryan K.M., Halsey C., Gottlieb E., Keaney E.P., Murphy L.O., Amaravadi R.K., Holyoake T.L., Helgason G.V. (2019) Targeting quiescent leukemic stem cells using second generation autophagy inhibitors. *Leukemia*. 33, 981–994.
- Yu Y., Yang L., Zhao M., Zhu S., Kang R., Vernon P., Tang D., Cao L. (2012) Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*. 26, 1752–1760.
- 36. Bellodi C., Lidonnici M.R., Hamilton A., Helgason G.V., Soliera A.R., Ronchetti M., Galavotti S., Young K.W., Selmi T., Yacobi R., Van Etten R.A., Donato N., Hunter A., Dinsdale D., Tirrò E., Vigneri P., Nicotera P., Dyer M.J., Holyoake T., Salomoni P., Calabretta B. (2009) Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1109–1123.
- Jung C.H., Ro S.H., Cao J., Otto N.M., Kim Do-Hyung D.H. (2010) MTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1287–1295.

632

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

# AUTOPHAGY DOES NOT CONTRIBUTE TO TKI RESPONSE IN A IMATINIB-RESISTANT CHRONIC MYELOID LEUKEMIA CELL LINE

S. Baykal-Köse<sup>1, \*</sup>, H. Efe<sup>2</sup>, and Z. Yüce<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Izmir Biomedicine and Genome Center (IBG), Dokuz Eylul University Health Campus, Inciralti-Balcova, Izmir, 35340 Turkey <sup>2</sup>Dokuz Eylul University, Medical School, Medical Biology Department, Izmir, 35330 Turkey \*e-mail: seda.baykalkose@gmail.com

Autophagy is an evolutionarily conserved cellular process in which components of the cytoplasm are delivered to lysosomes for degradation and has been proposed to play a role in imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells. Chronic myeloid leukemia is a clonal myeloproliferative disorder arising from the neoplastic transformation of the hematopoietic stem cell. We used a Bcr-Abl-independent and imatinib-resistant K562 subpopulation (K562-IR) that we generated earlier in our laboratory for this study. We showed that in the presence of imatinib autophagy was triggered via LC3-I/II transformation, p62 protein expression and acidic vacuoles accumulation in tyrosine kinase inhibitor-sensitive K562 cells; whereas in the cell line K562-IR which is imatinib-resistant and Bcr-Abl independent, autophagy is not triggered. With ongoing research and trails to combine tyrosine kinase inhibitors with autophagy inhibitors, our results suggest a model of resistance in which treatment with a TKI inhibitor does not increase autophagy, basically because its presence does not cause cellular stress due to Bcr-Abl signaling not being required for survival.

Keywords: autophagy, chronic myeloid leukemia, imatinib, CML, TKI resistance

# — МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ —

УДК 575.113.5:575.117.2

# USF1 ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФИБРИЛЛЯРНЫЙ КОЛЛАГЕН ТИПА I, II И III И pNP ADAMTS-3, В КЛЕТКАХ ОСТЕОСАРКОМЫ<sup>1</sup>

© 2021 г. М. Alper<sup>a, \*</sup>, Т. Aydemir<sup>b</sup>, F. Köçkar<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Medicinal and Aromatic Plants, Vocational School of Technical Sciences, Aksaray University, Aksaray, Turkey <sup>b</sup>Izmir Biomedicine and Genome Center, Izmir, 35340 Turkey <sup>c</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science and Literature, Balıkesir University, Balıkesir, 10145 Turkey \*e-mail: meltemalper@aksaray.edu.tr, biologmeltem@hotmail.com Поступила в редакцию 30.06.2020 г. После доработки 13.09.2020 г. Принята к публикации 13.09.2020 г.

Коллаген – важный компонент соединительных тканей человека. На экспрессию генов коллагена влияют различные факторы и цитокины, потенциально вовлеченные в развитие патологий, связанных с коллагенами. Нами показано, что фактор транскрипции USF1 регулирует экспрессию генов, кодирующих фибриллярные коллагены типа I, II и III, в остеобластах Saos-2 и MG-63. Эктопическая экспрессия гена *USF1* человека приводит к снижению экспрессии генов коллагенов на уровне мРНК и белка ADAMTS-3 – протеазы, ответственной за N-концевое расщепление предшественников коллагена типа I и II. Промотор гена *ADAMTS-3* содержит потенциальные сайты связывания USF1. Нами показано, что сверхэкспрессия *USF1* приводит к снижению уровня мРНК и белка ADAMTS-3. USF1 негативно регулирует активность промотора *ADAMTS-3*. Кроме того, с помощью EMSA показано, что USF1 связывается с промоторной областью *ADAMTS-3*. Таким образом, ADAMTS-3 и USF1 вносят вклад в регуляцию генов, кодирующих коллагены, при остеосаркоме.

**Ключевые слова:** ADAMTS-3, коллаген, USF1, остеосаркома, транскрипционная регуляция **DOI:** 10.31857/S0026898421040030

#### введение

Коллагены – наиболее распространенные белки внеклеточного матрикса, необходимы для прикрепления и миграции, пролиферации и дифференцировки клеток соединительной ткани [1, 2]. Коллагены I–III формируют фибриллы. Коллаген типа I — это основной коллаген костной ткани, сухожилий, кожи, связок, роговицы и многих интерстициальных соединительных тканей. Коллаген типа II является характерным компонентом гиалинового хряща. Коллаген типа III широко представлен в тканях, содержащих коллаген I, за исключением костной ткани. Коллаген типа III – важный компонент ретикулярных волокон в интерстициальной ткани легких, печени, дермы, селезенки и сосудов, образует смешанные фибриллы с коллагеном типа I, он локализуется также в эластических тканях [3-7]. Поскольку паттерны экспрессии генов, кодирующих коллаген, могут изменяться при различных патологиях, важно понять, как эти гены контролируются специфически-

Нами изучена регуляция генов коллагенов I– III и процессирующей коллаген ММП ADAMTS-3 фактором транскрипции USF1. В моделях остеосаркомы USF1 взаимодействует с Е-боксом, он играет существенную роль в эмбриональном развитии, а также участвует в регуляции дифференцировки хондроцитов [20, 21].

ми регуляторными факторами. Например, обнаружение повышенной экспрессии гена *CollA2* при остеосаркоме позволило использовать белковый пролукт этого гена в качестве лиагностического маркера. Коллагенолитические матриксные металлопротеиназы (ММП) необходимы для инвазии злокачественных клеток, включая клетки остеосаркомы [8–18]. На созревание остеобластов способны влиять и некоторые факторы транскрипции, взаимодействующие как с коллагеном. так и с генамисупрессорами опухолевого роста, что связано с патогенезом остеосаркомы. Влияние фактора транскрипции USF1 на экспрессию генов коллагена изучено не до конца. Показано, что связывание USF1 с Е-боксом в 3'-фланкирующей области стимулирует транскрипцию гена коллагена I [19].

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Статья представлена авторами на английском языке.

Нами показано, что белок USF1 негативно регулирует экспрессию генов коллагенов I-III в клетках Saos-2 и MG-63. Кроме того, мы изучали USF1-зависимую регуляцию ADAMTS-3. Как член семейства pNp, ADAMTS-3 в первую очередь отвечает за N-концевое расщепление фибриллярного проколлагена II, а также проколлагена типа I. Ранее мы охарактеризовали промотор гена ADAMTS-3 человека и идентифицировали его SP1-зависимую транскрипционную регуляцию [22]. Поскольку промотор гена ADAMTS-3 содержит потенциальные Е-боксы, мы оценили влияние USF1 на активность промотора ADAMTS-3. С использованием репортерной системы на основе гена люциферазы показано, что USF1 подавляет активность промотора ADAMTS-3, что приводит к снижению уровня как мРНК ADAMTS-3, так и соответствующего белка. Методом EMSA показано, что USF1 связывается с промотором ADAMTS-3. Представленные данные свидетельствуют о том, что фактор USF1 влияет на экспрессию ADAMTS-3 и, следовательно, способствует дерегуляции экспрессии генов коллагена при остеосаркоме.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток и транзиентная трансфекция. Клетки Saos-2 и MG-63 культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM, "Gibco", США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FCS, "Gibco") и 2 мМ *L*-глутамин ("Gibco"). Все клетки культивировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в инкубаторе. Генетические конструкции для изучения гена ADAMTS-3, а именно, pMET\_TS-3[-1340...+40], pMET TS-3[-879...+40], pMET TS-3 [-576...+40] и pMET\_TS-3 [-131...+40] получены, как описано ранее [22]. Плазмида, направляющая экспрессию USF1, подарена. Dipak P. Ramji (Cardiff School of Biosciences). Транзиентную трансфекцию генетических конструкций, содержащих промотор ADAMTS-3, проводили кальций-фосфатным методом [23]. Плазмиду, кодирующую USF1, трансфицировали одновременно с плазмидой, кодирующей промотор гена ADAMTS-3 и репортерный ген люциферазы (1 мкг). Плазмиду, направляющую экспрессию гена щелочной фосфатазы человека (SEAP, "Promega", США), также трансфицировали (0.5 мкг) в клетки для нормирования эффективности трансфекции. Активность люциферазы и SEAP измеряли в надосадочных жидкостях, собранных через 48 и 72 ч после трансфекции. с помощью набора Ready-To-Glow<sup>™</sup> Secreted Luciferase Reporter Systems ("Clontech", США) и люминометра Fluoroskan Ascent FL в соответствии с протоколом. Нормированную активность различных фрагментов промоторов оценивали по соотношению активностей люциферазы светлячка и SEAP. Контрольную плазмиду

pMetLuc и репортерную плазмиду pMetLuc ("Clontech") добавляли в разные лунки для каждого экспериментального повтора и использовали в качестве положительного и отрицательного контроля. Опыты по трансфекции повторяли не менее 3 раз [23].

Выделение РНК и количественная ОТ-ПЦР. Набор RNeasy Kit ("Thermo Scientific", США) использовали для выделения суммарной РНК из осадков клеток, трансфицированных плазмидой, направляющей экспрессию USF1 в соответствии с протоколом. Для синтеза кДНК использовали одинаковое количество РНК (1 мкг). кДНК синтезировали, как описано ранее [24]. кДНК (1 мкл) добавляли к 5 мкл Light Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green I mix ("Roche", Швейцария) в качестве матрицы и 0.5 мкл каждой пары праймеров (50 нг/мкл), указанных в табл. 1, в конечный объем ПЦР-смеси 10 мкл. ОТ-ПЦР проводили с использованием прибора Light Cycler 485 ("Roche Diagnostics", Швейцария) в следующих условиях: начальная денатурация 95°С в течение 10 мин, затем 35 циклов: 95°С, 15 с; 58°С, 15 с; 72°С, 10 с; и финальная элонгация 72°С, 1 мин. Результаты определяли в трех повторностях для каждого образца, значение *Ct* определяли автоматически. Относительные изменения экспрессии генов между контрольной группой и группой со сверхэкспрессией USF1 рассчитывали как 2<sup>-ΔΔCT</sup>, используя среднее между экспрессией генов В2-микроглобулина (h $\beta$ -2) и рибосомного белка L13 (RPL13A) человека в качестве внутреннего контроля [25].

Выделение белков и Вестерн-блотинг. Выделение белков буфером RIPA и Вестерн-блотинг образцов из контрольных и сверхэкспрессирующих USF1 клеток проводили в соответствии с ранее описанными протоколами [26]. Концентрацию белка определяли с использованием флуориметра Quibit. Белок (50 мкг) вносили в SDS-полиакриламидный гель. Мембраны инкубировали с первичными антителами: поликлональными к белку ADAMTS-3 (3 мкг/мл) ("Abcam", Великобритания, ab45037), поликлональными к коллагену типа II (Col2A1, 2.5 мкг/мл) ("Santa Cruz Biotech", sc7764) при 4°С в течение ночи или моноклональными к β-актину ("Santa Cruz Biotech", США, sc81178) при комнатной температуре в течение 1 ч. Мембраны промывали и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (комнатная температура, 1 ч). Мембраны проявляли с помощью ECL ("Thermo Scientific") и детектировали с использованием Fusion FX Vilber Lourmat. Количественный анализ проводили с помощью программного обеспечения ImageJ [27].

Анализ сдвига электрофоретической подвижности. 3'-Концы синтетических олигонуклеотидных зондов, специфичных к участкам (-641...-647) и (-973...-937) промотора ADAMTS-3, биотинилировали Biotin-11-UTP и терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазой (TdT) с использованием набора Biotin 3'-End Labeling Kit ("Thermo Scientific"), затем их отжигали с комплементарными им цепями при 95°С в течение 5 мин в dH<sub>2</sub>O. Анализ подвижности проводили с использованием хемилюминесцентного набора LightShift EMSA Kit ("Thermo Scientific") в соответствии с протоколом фирмы. В реакционную смесь объемом 20 мкл добавляли 4 мкг ядерного экстракта, 10% связующего буфера (340 мМ КСІ, 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреитола, 0.1 мМ EDTA, 40 мМ KCl) и 0.05 мкг/мл polv(dIdc) и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем в реакционную смесь добавляли 20 пмоль биотинилированных двухцепочечных олигонуклеотидов и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Конкурентный анализ EMSA проводили в тех же условиях, добавляя 10000-кратное количество тех же немеченых двухцепочечных нуклеотидов или немеченых консенсусных USF1-олигонуклеотидов для изучения функционального связывания USF1 (табл. 1). Цельные клеточные экстракты получали из контрольных клеток и клеток Saos-2, сверхэкспрессирующих USF1, как описано ранее [24]. Электрофорез проводили в 6%-ном нативном полиакриламидном геле. Для переноса комплексов на нейлоновую мембрану использовали систему полусухого переноса. Мембрану подвергали УФоблучению в течение 15 мин для сшивания. Сигналы биотина регистрировали с помощью хемилюминесцентного модуля для обнаружения нуклеиновых кислот Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module ("Thermofisher Scientific") в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ нуклеотидных последовательностей in silico. Предполагаемые сайты связывания факторов транскрипции в промоторной области гена *ADAMTS-3* предсказаны с помощью MatInspector (программное обеспечение Genomatix) с порогом 0.9 [28, 29].

Статистический анализ. Стандартные отклонения значений *p* рассчитывали с помощью программного обеспечения Mini Tab 14. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного метода ANOVA.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

USF1 снижает экспрессию генов коллагена человека (типа I, II и III) в клетках остеосаркомы

Известно, что ADAMTS-3 участвует в N-концевом процессинге проколлагена (главным образом коллагена типа II), поэтому мы определили уровни экспрессии генов коллагена типа I—III в перевиваемых остеобластах MG-63 и Saos-2. Количество мРНК оценивали методом ПЦР с использованием специфических пар праймеров (табл. 1). Показано, что как в клетках MG-63, так и Saos-2 преобладал коллаген типа I. В этих клетках обнаружены также коллагены типа III и II (рис. 1a,  $\delta$ ). Эти клетки также различаются по уровню экспрессии эндогенного *USF1* (рис. 1e).

Габлица 1	•	Последовательности праймеров	з, использованных в количественной	ОТ-ПЦР и EMSA
-----------	---	------------------------------	------------------------------------	---------------

Праймер	Нуклеотидная последовательность
ADAMTS-3 F человека	5'-TCAGTGGGAGGTCCAAATGCA-3'
ADAMTS-3 R человека	5'-GCAAAGAAGGAAGCAGCAGCC-3'
COL1A1 F человека	5'-CTAGACATGTTCAGCTTTGTGGACCT-3'
COL1A1 R человека	5'-GTTGTCGCAGACGCAGATCCG-3'
COL2A1 F человека	5'-TCGGAGAGTGCTGCCCCATCT-3'
COL2A1 R человека	5'-GGCAGCAAAGTTTCCACCAAGA-3'
COL3A1 F человека	5'-AGCTGGCTACTTCTCGCTCTGCT-3'
СОL3А1 R человека	5'-GTTCTGAGGACCAGTAGGGCATGA-3'
USF F человека	5'-ACGTCTTCCGAACTGAGAATGG-3'
USF R человека	5'-GGTGAAAGCTCCCTGGATCA-3'
β-2-Микроглобулин F человека	5'-TTTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'
β-2-Микроглобулин R человека	5'-CATGTCTCCATCCCACTTAACT-3'
RPL13A F	5'-CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3'
RPL13A R	5'-TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA-3'
[—641—607] проба	5'-CATGATGTGGGCGCCACGGCGGGGGGGGGGGGCAGTCCG-3' 5'-CGGACTGCCCCCTCCCGCCGTGGCGCCCCACGTCATG-3'
[-973937] проба	5'-GACTGGTGCCTGGAAGGGAGATCACCGCGTGGTTAAG-3' 5-'CTTAACCACGCGGTGATCTCCCTTCCAGGCACCAGTC-3'

636
Чтобы оценить влияние белка USF1 на экспрессию этих типов коллагена, плазмиду, направляющую экспрессию *hUSF1*, трансфицировали в клетки MG-63 и Saos-2. Сверхэкспрессия USF1 подтверждена методом количественной ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров к *USF1* (табл. 1) (рис. 1*г., ж*). Сверхэкспрессия USF1 в клетках MG-63 приводит к снижению экспрессии генов всех типов коллагена на уровне мРНК (рис. 1*д*). Экспрессия гена коллагена типа II снижается в 0.02 раза, III – в 0.2 и I – в 0.6 раза на уровне мРНК (рис. 1∂). Эффект снижения уровня коллагена типа II выявлен при проведении вестерн-блот-анализа (рис. 1e). Влияние USF1 на коллаген этих типов изучено также на другой модели остеобластных клеток, Saos-2, чтобы лучше понять регуляцию экспрессии коллагена с помощью USF1 в клетках остеосаркомы. Сверхэкспрессия гена USF1 приводит к аналогичному снижению уровня мРНК всех типов коллагена статистически значимым образом (мРНК коллагенов I, II и III в 0.3, 0.4 и 0.3 раза соответственно). В клетках Saos-2 снижение уровня мРНК генов коллагена I и III было более выраженном, чем в MG-63 (рис. 13).

#### USF1 подавляет экспрессию гена ADAMTS-3 в двух различных моделях остеосаркомы

Чтобы оценить, регулирует ли белок USF1 экспрессию гена ADAMTS-3, методом количественной ОТ-ПЦР определили уровень мРНК ADAMTS-3 в образцах клеток MG-63, сверхэкспрессирующих USF1, и в контрольных образцах. Сверхэкспрессия USF1 привела к значительному снижению уровня мРНК ADAMTS-3 — в 0.4 раза по сравнению с контрольной группой (рис. 2*a*). Хотя USF1 значительно подавляет экспрессию мРНК гена ADAMTS-3, неизвестно, может ли USF1 снижать уровень кодируемого им белка. Уровень белка ADAMTS-3 детектировали также методом вестерн-блотинга в образцах клеток, сверхэкспрессирующих USF1 или контрольных. мPHK USF1 снижала уровень белка ADAMTS-3 в 0.56 раза (р ≤ 0.005, рис. 2б).

Снижение уровня мРНК и белка ADAMTS-3 в ответ на сверхэкспрессию *USF1* было более выраженным в другой линии клеток остеосаркомы — Saos-2. В результате показали, что USF1 способен снижать уровень мРНК ADAMTS-3 (в 0.24 раза) и белка (в 0.2 раза) по сравнению с контролем (рис. 2*в*, *г*).

# USF1 негативно регулирует активность промотора ADAMTS-3 в клетках Saos-2 и MG-63

USF — это транскрипционный фактор с мотивом спираль-петля-спираль, который взаимодействует с последовательностями Е-бокса в геноме [30]. Последовательности Е-бокса выявлены в положениях -1315...-1331, -1051...-1068, -933...-950, и -614...-642 в области промотора гена ADAMTS-3. Чтобы понять, влияет ли USF1 на активность промотора ADAMTS-3, плазмиду, направляющую экспрессию USF1, котрансфицировали с четырьмя разными неполными фрагментами промотора ADAMTS-3, сконструированными ранее, а именно pMET TS3[-131...+40], pMET TS3[-576...+40], рМЕТ ТS3[-879...+40] и рМЕТ ТS3[-1340...+40], и определили люциферазную активность [24]. Как показано на рис. 3a, сверхэкспрессия USF1 незначительно снижает относительную активность люциферазы pMET\_TS3[-131...+40] и рМЕТ TS3[-576...+40], которая не содержит мотива связывания USF1. Статистически значимым было снижение относительной люциферазной активности при исследовании промоторных конструкций pMET TS3[-879...+40] и pMET TS3[--1340...+40], содержащих Е-бокс, в клетках MG-63. Поскольку активность USF1 различалась в разных клетках, определили влияние этого фактора на активность промотора ADAMTS-3 и в других клетках остеосаркомы - Saos-2 [31]. В соответствии с данными, полученными на клетках MG-63, USF1 подавлял активность всех генетических вариантов промотора ADAMTS-3. Репрессия была статистически значимой в случае конструкции pMET\_TS3[-1340...+40].

### USF1 функционально связывает мотивы E-бокса в промоторной области ADAMTS-3

Взаимодействие между белком USF1 и промотором гена ADAMTS-3 изучали с помощью EMSAанализа с использованием ядерных экстрактов клеток Saos-2 и биотин-меченых олигонуклеотидных зондов, а именно, консенсусного USF1-зонда, зонда 1 [-131...-103], зонда 2 [-641...-607] и зонда 3 [-973...-937]. Когда биотинилированный консенсусный зонд USF1 инкубировали с ядерным экстрактом Saos-2, в геле обнаруживали один комплекс (рис. 36, дорожка 2). Специфичность последовательности ДНК-белкового комплекса проверяли, добавляя немеченый зонд USF1, в реакции связывания. Немеченый олигонуклеотид уменьшал образование комплекса (данные не показаны). Образование комплекса было сильнее, когда ядерный экстракт клеток, сверхэкспрессирующих USF1, инкубировали с биотинилированным зондом USF1, что свидетельствует о взаимодействии между USF1 и промотором ADAMTS-3 (рис. 36, дорожка 3). Более прямые доказательства взаимодействия USF1 с последовательностями Е-бокса в ядерных экстрактах клеток Saos-2 получали с помощью EMSA с использованием зондов [-641...-607] и [-973...-937]. В геле обнаружен один комплекс (рис. 3г. дорожки 5 и 8). Повышенная интенсивность образования ком-



**Рис. 1.** *а*,  $\delta$  – Уровни экспрессии мРНК генов коллагенов I, II и III в клетках MG-63 и Saos-2. *в* – Уровни эндогенной экспрессии мРНК гена *USF1* в клетках Saos-2 и MG-63. *г* – Подтверждение эктопической экспрессии USF на уровне мРНК в клетках MG-63 через 48 ч после трансфекции.  $\partial$  – Уровни мРНК коллагена I, II и III в клетках MG-63, сверх-экпрессирующих USF1. *е* – Уровень коллагена типа II в клетках MG-63, сверхэкпрессирующих USF1. *ж* – Подтверждение эктопической экспрессии USF на уровне мРНК в клетках Saos-2 через 48 ч после трансфекции. 3 – Уровни мРНК коллагена типа I, II и III в клетках Saos-2, сверхэкпрессирующих USF1. Звездочка – статистически значимые различия между группами (\**p* ≤ 0.05).

плексов в образцах, полученных из клеток, сверхэкспрессирующих USF1, указывает на специфическое взаимодействие между белком USF1 и промотором *ADAMTS-3* (рис. 3*г*, дорожки 6 и 9).

По данным биоинформатического анализа последовательность Е-бокса не обнаружена в области [-131...-103] промотора *ADAMTS-3*. Однако при использовании зонда [-131...-103] и ядерного экстракта Saos-2 в экспериментах EMSA получены три различных комплекса (рис. 3*в*, дорожка 2). Добавление немеченого зонда [-131...-103] препятствовало образованию комплексов 1 и 2, что указывает на специфическое связывание этого зонда с промотором *ADAMTS-3* (рис. 3*в*, дорожка 3). Конкурентное связывание консенсусного зонда USF1 с зондом [-131...-103] также исключало образование комплексов 1 и 2. Эти результаты указывают на функциональное связывание белка USF1 с областью -131...-103 промотора *ADAMTS-3*.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Многообразие коллагенов и важность их функций послужила причиной проведения многочисленных исследований, направленных на



**Рис. 2.** *а*,  $\delta$  – Экспрессия гена *ADAMTS-3* на уровне мРНК и белка в клетках MG-63, сверхэкспрессирующих USF1. *в*, *е* – Экспрессия гена *ADAMTS-3* на уровне мРНК и белка в клетках Saos-2, сверхэспрессирующих USF1. Звездочка – статистически значимые различия между группами (\**p* ≤ 0.05).

изучение регуляторных элементов генов коллагенов, чтобы лучше понять молекулярные механизмы, контролирующие экспрессию этих генов в норме и при патологии. Регуляция транскрипционной активности генов коллагенов во многом зависит от типа клеток и других регуляторных факторов. Например, SOX9 действует как энхансер экспрессии коллагена типа II [32]. Обнаружено, что ELF3 модулирует транскрипцию гена коллагена типа II в хондроцитах [33]. Показано также, что YY1 может действовать как положительный регулятор транскрипции гена коллагена типа I [34]. В свою очередь, опосредованную USF1 регуляцию генов коллагена (I, II и III) ранее не изучали. Нами изучено влияние USF1 на транскрипцию гена коллагена типа II, основного субстрата ADAMTS-3, а также коллагенов I и III в моделях остеосаркомы. Помимо своей основной функции – N-концевого процессинга коллагена типа II, ADAMTS-3 способствует созреванию коллагенов типа I [35]. Согласно исследованиям, проведенным нами на клетках MG-63 и Saos-2, уровни экспрессии мРНК коллагенов типа I, II и III в этих линиях различаются, причем относительное содержание типов коллагена в этих клетках коррелирует с данными, полученными ранее [36, 37]. В обоих типах клеток сверхэкспрессия USF1 приводила к статистически значимому снижению уровней мРНК коллагенов типа I, II, III. Сверхэкспрессия USF1 приводила также к снижению уровня коллагена типа II, что подтверждает результат количественного определения мРНК в клетках MG-63. Влияние белка USF1 на экспрессию мРНК генов коллагена типа II и III в клетках MG-63 было сильнее выражено, чем в клетках Saos-2. С другой стороны, сверхэкспрессия USF1 в клетках Saos-2 приводила к сильному снижению уровня мРНК коллагена типа I.

Во-вторых, мы сосредоточились на опосредованной USF1 транскрипционной регуляции *ADAMTS-3*, вовлеченного в N-концевой процессинг проколлагенов I и II, а также на участии Е-бокса в промоторной области *ADAMTS-3*. Известно, что USF1 функционирует, взаимодействуя с мотивами E-бокса в геномных последовательностях. Итак, мы подумали, что USF1, вероятно, ре-



**Рис. 3.** *а* – Относительная люциферазная активность промоторных репортерных конструкций *ADAMTS-3* в клетках MG-63 и Saos-2, сверхэкспрессирующих USF. Схематическое изображение репортерных конструкций, использованных для транзиентной трансфекции (слева). Последовательности Е-бокса показаны треугольниками. *б*, *в*, *г* – *in vitro* анализ связывания USF1 с промотором *ADAMTS-3* методом EMSA. Звездочка – статистически значимое различие между группами (\* $p \le 0.05$ ).

гулирует транскрипцию ADAMTS-3. Нами установлено, что в результате сверхэкспрессии USF1 в клетках MG-63 уровни экспрессии мРНК и белка ADAMTS-3 снизились в 0.6 раза. USF1 также уменьшил экспрессию мРНК и белка ADAMTS-3 в 0.2 раза в других клетках той же природы — Saos-2. Кроме того, мы показали, что котрансфекция белка USF1 снижает активность промотора ADAMTS-3. USF1 снижал максимальную активность промотора *ADAMTS-3* рМЕТ\_ТS3 [-1340...+40] и рМЕТ TS3 [-879...+40], включающего мотивы Е-бокс, в клетках Saos-2. Хотя USF1 экспрессируется в клетках всех типов, однако уровень экспрессии зависит от типа клеток. Различия в уровнях экспрессии USF1, его транскрипционных кофакторов или других ДНК-связывающих белков могут приводить к изменению транскрипционной активности. Чтобы объяснить это, эффект белка USF1 был изучен на другой модели остеосаркомы - клетках MG-63. Как и в клетках Saos-2, USF1 подавлял активность промотора ADAMTS-3 и в клетках MG-63. Наконец, функциональное связывание белка USF1 с промотором ADAMTS-3 показано методом EMSA. Помимо консенсусного зонда USF1, зонды с последовательностью Е-бокса, покрывающие области [-973...-937] и [-641...-607], формировали комплексы в геле. Кроме того, образование этих комплексов усиливалось при использовании клеточных экстрактов, сверхэкспрессирующих USF1. Хотя зонд, покрывающий область [-131...-103], не содержит последовательности Е-бокса, методом EMSA подтверждено функциональное связывание USF1 с этой областью, вероятно, из-за функциональных взаимодействий между USF1 и другими регуляторными элементами. Таким образом, нами показано, что

640

USF1 способен регулировать на уровне транскрипции синтез коллагенов типа I, II и III при остеосаркоме. USF1 связывает мотивы E-бокса в промоторе гена *ADAMTS-3* и отрицательно регулирует этот ген, влияя тем самым на N-концевой процессинг проколлагенов типа II и I. Эти результаты способствуют пониманию регуляции генов коллагена и *ADAMTS-3* в клетках остеосаркомы.

Клетки Saos-2 и экспрессионная плазмида USF1 любезно предоставлены Kenneth Wann и Dipak P. RAMJI (Cardiff, School of Biosciences, Cardiff UK) соответственно. Клетки MG-63 любезно предоставлены Berivan ÇEÇEN (Dokuzeylül University, Izmir, TURKEY).

Работа поддержана Советом по научно-техническим исследованиям Турции (TUBITAK), проект номер 114Z025.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baumann S., Hennet T. (2016) Collagen accumulation in osteosarcoma cells lacking GLT25D1 collagen galactosyltransferase. J. Biol. Chem. 291, 18514–18524. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.723379
- Myllyharju J., Kivirikko K.I. (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20, 33–43. https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.11.004
- Gelse K., Poschl E., Aigner T. (2003) Collagens structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(12), 1531–1546. https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002
- Von der Mark K. (1999) Structure, biosynthesis and gene regulation of collagens in cartilage and bone. In:
- Dynamics Bone Cartilage Metabolism. Eds Seibel M.J., Robins S.P., Bilezikian J.P. San Diego: Acad. Press. 3–29.
  Hulmes D.J., Miller A. (1981) Molecular packing in
- collagen. *Nature*. **293**, 234–239. https://doi.org/10.1038/230437a0
- Rossert J., de Crombrugghe B. (2002) Type I collagen: structure, synthesis and regulation. In: *Principles in Bone Biology*. Eds Bilezkian J.P., Raisz L.G., Rodan G. Orlando: Acad. Press, 189–210.
- 7. Von der Mark K. (1981) Localization of collagen types in tissues. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 9, 265–324.
- Wu D., Chen K., Bai Y., Zhu X., Chen Z., Wang C., Zhao Y., Li M. (2014) Screening of diagnostic markers for osteosarcoma. *Mol. Med. Repts.* **10**, 2415–2420. https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2546
- Pratap J., Galindo M., Zaidi S.K., Vradii D., Bhat B.M., Robinson J.A., Choi J.Y., Komori T., Stein J.L., Lian J.B., Stein G.S., van Wijnen A.J. (2003) Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. *Cancer Res.* 63(17), 5357– 5362.

- Thomas D.M., Johnson S.A., Sims N.A., Trivett M.K., Slavin J.L., Rubin B.P., Waring P., McArthur G.A., Walkley C.R., Holloway A.J., Diyagama D., Grim J.E., Clurman B.E., Bowtell D.D., Lee J.S., Gutierrez G.M., Piscopo D.M., Carty S.A., Hinds P.W. (2004) Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27KIP1, is disrupted in osteosarcoma. *J. Cell Biol.* 167(5), 925–934. https://doi.org/10.1083/jcb.200409187
- Thomas D.M., Carty S.A., Piscopo D.M., Lee J.S., Wang W.F., Forrester W.C., Hinds P.W. (2001) The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol. Cell.* 8, 303–316. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00327-6
- Mignatti P., Rifkin D.B. (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* 73, 161–195. https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.1.161
- Holmbeck K., Bianco P., Caterina J., Yamada S., Kromer M., Kuznetsov S.A., Mankani M., Robey P.G., Poole A.R., Pidoux I., Ward J.M., Birkedal-Hansen H. (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell.* 99, 81–92.
- Makareeva E., Han S., Vera J.C., Sackett D.L., Holmbeck K., Phillips C.L., Visse R., Nagase H., Leikin S. (2010) Carcinomas contain a matrix metalloproteinase-resistant isoform of type I collagen exerting selective support to invasion. *Cancer Res.* **70**(11), 4366–4374. https://doi.org/10.1158/0008-5472
- Yong H.Y., Moon A. (2007) Roles of calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, in invasive phenotype of human gastric cancer cells. *Arch. Pharm. Res.* 30, 75–81.
- Chen P.N., Kuo W.H., Chiang C.L, Chiou H.L., Hsieh Y.S., Chu S.C. (2006) Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chem.-Biol. Interact.* 163, 218–229. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.08.003
- Nabha S.M., dos Santos E.B., Yamamoto H.A., Belizi A., Dong Z., Meng H., Saliganan A., Sabbota A., Bonfil R.D., Cher M.L. (2008) Bone marrow stromal cells enhance prostate cancer cell invasion through type I collagen in an MMP-12 dependent manner. *Int. J. Cancer.* **122**(11), 2482–2490. https://doi.org/10.1002/ijc.23431
- Mori K., Enokida H., Kagara I., Kawakami K., Chiyomaru T., Tatarano S., Kawahara K., Nishiyama K., Seki N., Nakagawa M. (2009) CpG hypermethylation of collagen type I α 2 contributes to proliferation and migration activity of human bladder cancer. *Int. J. Oncol.* 34, 1593–1602.

https://doi.org/10.3892/ijo\_00000289

- 19. Rippe R.A., Umezawa A., Kimball J.P., Breindl M., Brenner D.A. (1997) Binding of upstream stimulatory factor to an E-box in the 3'-flanking region stimulates a1(I) collagen gene transcription. *J. Biol. Chem.* **272**(3), 1753–1760.
- Datta T.K., Rajput S.K., Wee G., Lee K., Folger J.K., Smith G.W. (2015) Requirement of the transcription factor USF1 in bovine oocyte and early embryonic development. *Reproduction*. 149, 203–212.
- Goldring M.B., Sandell L.J. (2007) Transcriptional control of chondrocyte gene expression. *Osteoarthritis, Inflammation Degradation: A Continuum.* Eds Buckwalter J.A., Lotz M., Stoltz J.F. **70**, 118–142.

- 22. Aydemir T.A., Alper M., Kockar F. (2018) SP-1 mediated downregulation of ADAMTS3 gene expression in osteosarcoma models. *Gene*. **659**, 1–10.
- Kockar F.T., Foka P., Hughes T.R., Kousteni S., Ramji D.P. (2001) Analysis of the *Xenopus laevis* CCAAT-enhancer binding protein alpha gene promoter demonstrates species-specific differences in the mechanisms for both autoactivation and regulation by Sp1. *Nucl. Acids Res.* 29, 362–372.
- Alper M., Kockar F. (2014) IL-6 upregulates a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 (ADAMTS-2) in human osteosarcoma cells mediated by JNK pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 393, 165–175.
- 25. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DeltaDeltaC(T)) method. *Methods*. **25**(4), 402–408.
- 26. Tokay E., Kockar F. (2016) Identification of intracellular pathways through which TGF-β1 upregulates URG-4/URGCP gene expression in hepatoma cells. *Life Sciences.* 144, 121–128. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.12.010
- Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. (2012) NIH image to image: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* 9, 671–675.
- Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., Werner T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucl. Acids Res.* 23, 4878–4884.
- Cartharius K., Grote K., Klocke B., Haltmeier M., Klingenhoff A., Frisch M., Bayerlein M., Werner T. (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* 21, 2933–2942.

https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti473

 Kiermaier A., Gawn J.M., Desbarats L., Saffrich R., Ansorge W., Farrell P.J., Eilers M., Packham G. (1999) DNA binding of USF is required for specific E-box dependent gene activation *in vivo. Oncogene.* **18**(51), 7200–7211. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203166

- Qyang Y., Luo X., Lu T., Ismail P.M., Krylov D., Vinson C., Sawadogo M. (1999) Cell-type dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 19(2), 1508–1517.
- 32. Yasuda H., Oh C., Chen D., Crombrugghe B., Kim J.H. (2017) A novel regulatory mechanism of type II collagen expression via a SOX9-dependent enhancer in intron 6. J. Biol. Chem. 292(2), 528–538. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.758425
- 33. Otero M., Peng H., Hachem K.E., Culley K.L., Wondimu E.B., Quinn J., Asahara H., Tsuchimochi K., Ko Hashimoto K., Goldring M.B. (2017) ELF3 modulates type II collagen gene (COL2A1) transcription in chondrocytes by inhibiting SOX9-CBP/p300-driven histone acetyltransferase activity. *Connect. Tissue Res.* 58(1), 15–26. https://doi.org/10.1080/03008207.(2016)1200566
- 34. Riquet F.B., Tan L., Choy B.K., Osaki M., Karsenty G., Osborne T.F., Auron P.E., Goldring M.B. (2001) YY1 is a positive regulator of transcription of the *Col1a1* gene. J. Biol. Chem. 276(42), 38665–38672.
- 35. Le Goff C., Somerville R.P., Kesteloot F., Powell K., Birk D.E., Colige A.C., Apte S.S. (2006) Regulation of procollagen amino-propeptide processing during mouse embryogenesis by specialization of homologous ADAMTS proteases: insights on collagen biosynthesis and dermatosparaxis. *Development*. 133(8), 1587–1596.
- Pautke C., Schieker M., Tischer T., Kolk A., Neth P., Mutschler W., Milz S. (2004) Characterization of osteosarcoma cell lines MG63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res.* 24, 3743–3748.
- Fernandes R.J., Harkey M.A., Weis M., Askew J.W., Eyre D.R. (2007) The post-translational phenotype of collagen synthesized by Saos-2 osteosarcoma cells. *Bone*. 40(5), 1343–1351.

## USF1 SUPPRESSES EXPRESSION OF FIBRILLAR TYPE I, II, AND III COLLAGEN AND pNP ADAMTS-3 IN OSTEOSARCOMA CELLS

### M. Alper<sup>1, \*</sup>, T. Aydemir<sup>2</sup>, and F. Köçkar<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Medicinal and Aromatic Plants, Vocational School of Technical Sciences, Aksaray University, Aksaray, Turkey <sup>2</sup> Izmir Biomedicine and Genome Center, Izmir, 35340 Turkey

<sup>3</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science and Literature, Balıkesir University, Balıkesir, 10145 Turkey

\*e-mail: meltemalper@aksaray.edu.tr, biologmeltem@hotmail.com

Collagens are the main components of human tissues. Various regulatory factors and cytokines may influence expression levels for collagen-encoding genes, and, therefore, contrubite to some collagen-associated pathologies. In this study, we demonstrate regulatory effects of USF1 on expression of genes encoding fibrillar collagen types I, II, and III. In osteoblastic Saos-2 and MG-63 cells. An ectopic expression of the human USF1 led to a decrease in both mRNA and protein expression levels of the collagen-encoding genes mentioned above. ADAMTS-3 is a proteinase primarily responsible for the amino-terminal cleavage of type I and type II collagen precursors. The *ADAMTS-3* promoter region contains potential binding sites for USF1. Here we show that an overexpression of USF1 lead to a decrease in ADAMTS-3 mRNA and protein expression levels. In co-transfection studies, USF1 negatively regulated *ADAMTS-3* promoter activity. Further, in EMSA studies, we showed that USF1 binds to the *ADAMTS-3* promoter region. In conclusion, it seems that ADAMTS-3 and USF1 contribute to the regulation of collagen encoding genes in osteosarcoma.

Keywords: ADAMTS-3, collagen, USF1, osteosarcoma, transcriptional regulation

### — МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ —

УДК 57.05:57.016.4;616-006.04

# МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ, КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ В 3D СИСТЕМЕ, ПОДАВЛЯЮТ РОСТ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО ЗА СЧЕТ ЗАВИСИМОЙ ОТ IL-24 РЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ p38 МАРК И СХСR4/АКТ<sup>1</sup>

© 2021 г. F. Suo<sup>a</sup>, M. Pan<sup>a</sup>, Y. Li<sup>a</sup>, Q. Yan<sup>a</sup>, H. Hu, L. Hou<sup>a</sup>, \*

<sup>a</sup>College of Life Sciences and Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing, 100044 PR China

\*e-mail: llhou@bjtu.edu.cn Поступила в редакцию 07.06.2020 г. После доработки 17.08.2020 г. Принята к публикации 15.09.2020 г.

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) широко распространен во всем мире и характеризуется высоким уровнем смертности. Несмотря на то, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) рассматривают в качестве возможного средства для терапии онкологических заболеваний, данные по их влиянию на клетки НМРЛ противоречивы, что связано, прежде всего, с использованием двумерной (2D) культуральной системы. В то же время трехмерные (3D) условия культивирования воспроизводят тканевую организацию *in vivo*. Проведено детальное исследование противоопухолевых свойств МСК в 3D-условиях культивирования клеток (3D-МСК) НМРЛ. Подтверждено более эффективное супрессорное действие 3D-МСК на пролиферацию и миграцию клеток НМРЛ по сравнению с МСК, культивируемыми в 2D-условиях. В 3D-МСК избыточно экспрессирован интерлейкин-24 (IL-24), который относится к ключевым факторам, усиливающим противоопухолевое действие МСК. В этих клетках IL-24 влияет на сигнальные пути p38 МАРК и СХСR4/АКТ. Таким образом, в проведенном исследовании подтверждена эффективность использования MCК в терапии опухолей.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, трехмерная клеточная культура, противоопухолевое действие, немелкоклеточный рак легкого, интерлейкин-24 DOI: 10.31857/S002689842104011X

Рак легких характеризуется высокой смертностью во всем мире. Более 85% случаев рака легкого относится к его немелкоклеточному подтипу (НМРЛ) [1]. Традиционные методы лечения НМРЛ, такие как хирургия, химио- и лучевая терапия, обладают серьезными ограничениями. На ранней стадии НМРЛ чрезвычайно трудно обнаружить, что приводит к снижению выживаемости больных. Терапия стволовыми клетками набирает популярность как новая стратегия лечения онкологических заболеваний. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) характеризуются высокой дифференцировочной активностью, способностью мигрировать к месту опухоли и секретировать биологически активные вещества [2], что позволяет считать их подходящими кандидатами для противоопухолевой терапии [3, 4]. Некоторые секретируемые МСК факторы ингибируют рост клеточных линий НМРЛ при совместном культивировании [5, 6]. Так, ранее нами

показано, что МСК супрессируют рост клеток НМРЛ паракринным способом – как *in vitro*, так и *in vivo* [7]. Кроме того, МСК пригодны для использования в качестве клеток-киллеров, нацеленных на раковые клетки легких или на стволовые клетки опухоли рака легкого [8, 9]. Однако целесообразность использования МСК для лечения НМРЛ пока не подтверждена. Так, по некоторым данным [10–13], МСК могут способствовать развитию рака легкого, а не останавливать его.

Одна из причин противоречий в результатах может быть связана с использованием двумерных (2D) моделей культивирования, которые не воспроизводят условия, наблюдаемые в тканях человека. В последнее время интерес к трехмерным (3D) системам культивирования клеток возрос, так как они моделируют микроокружение ткани [14, 15]. Во многих 3D-системах культивирования клеток используют матриксы из коллагена I типа, которые подходят для этого благодаря их пластичности и низкой стоимости [16, 17]. Системы

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Статья представлена авторами на английском языке.

3D-культивирования, полученные на основе коллагена I типа и матригеля [18] или гидрогеля внеклеточного матрикса [19], стимулируют пролиферацию МСК и повышают их секреторную активность. Ранее нами показано, что уровень интерлейкина-24 (IL-24) в МСК, культивируемых в 3D-системе (3D-MCK), примерно в 20 раз выше, чем в 2D-культуре [18]. Цитокин IL-24 относится к опухолевым супрессорам и вызывает гибель ряда различных видов опухолевых клеток [20-22]. Однако детальный механизм ингибирующего действия IL-24, секретируемого 3D-MCK, на клетки НМРЛ до сих пор не выяснен. Нами исследовано ингибирующее действие 3D-MCK на клеточные линии NCI-H460: H460 и SK-MES-1: MES in vitro и проанализированы задействованные в этом процессе сигнальные механизмы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии. МСК костного мозга человека приобретены у компании "Cyagen" (США). Клеточная линия НМРЛ человека NCI-H460 (крупноклеточная карцинома) любезно предоставлена Dr. Jiang, работающим в нашей лаборатории. Линия НМРЛ человека SK-MES-1 (плоскоклеточная карцинома) приобретена в Китайской инфраструктуре клеточных линий (China infrastructure of cell line resources, Китай). Все клеточные линии идентифицированы методом генотипирования STR ("Micro-read Gene Biotechnology", Китай). МСК культивировали в полной среде HBMMSC, которая содержала 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) и 1% глутамина ("Gibco", США). Клетки H460 и MES культивировали в среде DMEM ("Gibco"), содержащей 10% FBS и 1% глутамина. Все клетки инкубировали в клеточном инкубаторе при температуре 37°С и 5% СО<sub>2</sub>.

**3D-культивирование**. Для приготовления форм для матриксов в лунки 12-луночного планшета добавляли по 1 мл 2%-ного стерильного жидкого агара, дожидались его застывания при комнатной температуре и затем в каждую лунку по углам агара вставляли 4 стерильных капилляра. Коллаген I типа из хвоста крысы ("BD", США) смешивали с  $2 \times$  DMEM в соотношении 1 : 1 (v/v), добавляли 10% матригеля ("Corning", США) и 1 × 10<sup>6</sup> клеток/мл МСК. Полученную смесь быстро перемешивали и хранили на льду. В каждую стерильную лунку агара добавляли по 1 мл полученной смеси и планшет помещали в клеточный инкубатор на 20 мин. После полимеризации в каждую лунку планшета вносили 1 мл полной среды.

Конструирование плазмиды pIRES2-EGFP-IL-24 для сверхэкспрессии *IL24* и плазмиды pGPH1-GFP-IL-24 с короткой шпилечной PHK (shPHK) для сайленсинга *IL24*. Плазмида pGPH1-GFP-IL-24 была разработана и сконструирована компанией "GenePharma Pharmaceutical Technology Co., Ltd." (Китай).

Процесс конструирования плазмиды pIRES2-EGFP-IL-24 состоял из нескольких стадий. Тотальную РНК выделяли из МСК с помощью реагента TRIzol ("Cwbiotech", Китай). кДНК синтезировали, используя систему обратной транскрипции GoScript ("Promega", США), и амплифицировали методом ПЦР с парами праймеров к гену *IL24* (табл. 1). Амплифицированный продукт и экспрессионный вектор pIRES2-EGFP обрабатывали рестриктазами XhoI и BamHI. Для встраивания фрагмента в экспрессионный вектор использовали ДНК-лигазу Т4. Полученную рекомбинантную плазмиду трансформировали в DH5α-компетентные клетки Escherichia coli, которые культивировали на агаровой чашке, содержащей канамицин, в течение 16 ч. Рекомбинантную плазмиду pIRES2-EGFP-IL-24 экстрагировали с помощью мининабора E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Mini Kit I ("Omega Biotek", Китай). Структуру рекомбинантных плазмид подтверждали, используя расщепление рестриктазами. ПШР и секвенирование, проведенное в компании "BGI" (Китай).

Белок	Ген	Праймеры <sup>а</sup> , 5' $\rightarrow$ 3'	Длина, п.н.	$T_{\rm пл}$ , °С	Число циклов
IL-24	IL24	F: ccgctcgaggccaccatgaattttcaacagagg R: cgggatccgagcttgtagaatttctg	621	55	30
IL-22R1	IL22RA1	F: ctgtccgagatcacctacttagg R: gcacatttgggtcagatgttctgtc	481	55	30
IL-20R1	IL20RA	F: gctcagccttctgagaagcagtg R: cgcacaaatgtcagtggttctgac	552	55	30
IL-20R2	IL20RB	F: gctggtgctcactcactgaaggt R: tctgtctggctgaaggcgctgta	406	55	30

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР

<sup>а</sup> F – прямой праймер; R – обратный праймер.

Получение МСК, модифицированных плазмидами pIRES2-EGFP-IL-24 (MCK-O) и pGPH1-GFP-IL-24 (MCK-S). В 6-луночные планшеты высевали MCK (1.25 × 10<sup>5</sup> клеток/лунка) и трансфицировали pIRES2-EGFP-IL-24 или pGPH1-GFP-IL-24 с помошью Lipofectamine Stem Transfection Reagent ("Thermo Fisher Scientific", CIIIA). Через 48 ч трансфицированные МСК культивировали в присутствии 150 мкг/мл G418 (Geneticin; "Amresco", США), а затем в среде, содержащей 80 мкг/мл G-418, пока доля клеток с зеленой флуоресценцией не достигала ~50%. В среду вносили 500 нг/мл гидрокортизона ("PeproTech", США), 10 нг/мл инсулиноподобного фактора роста I (IGF-1; "PeproTech") и 10 нг/мл эпидермального фактора роста (EGF; "PeproTech"). Культуральную среду заменяли на свежую каждые двое суток. Через 14 суток МСК со сверхэкспрессией или подавлением IL24 культивировали в 3Dусловиях, как описано выше для получения МСК-О или МСК-Ѕ соответственно.

Сбор кондиционированных сред (КС). Клетки 2D-MCK, 3D-MCK, MCK-O и MCK-S (1.25 × × 10<sup>5</sup> клеток/мл) культивировали на 12-луночных планшетах в течение 12 ч, после чего КС собирали и фильтровали с использованием 0.22-мкм мембран ("PALL", США) для последующих экспериментов.

МТТ-тест. Для изучения влияния 2D- и 3D-МСК на клетки H460 и MES в культуры НМРЛ в 96-луночных планшетах вносили несколько видов КС от МСК. В контрольную группу добавляли полную среду HBMMSC. Выживаемость клеток H460 и MES определяли через 24, 48 и 72 ч с использованием МТТ ("Sigma", Германия). Сначала в каждую лунку добавляли 20 мкл реагента MTT (0.5 мг/мл) и помешали в клеточный инкубатор при температуре 37°С на 4 ч, после чего среду тщательно отбирали, вносили в каждую лунку 150 мкл DMSO ("Sigma") и перемешивали в течение 2 мин для полного растворения кристаллов. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на микропланшетном спектрофотометре ("Tecan", Австрия). Для каждой экспериментальной группы использовали 6 лунок. Ингибирующую способность (IR) КС от МСК на пролиферацию клеток H460 и MES рассчитывали по следующей формуле:

$$IR = (1 - A_{ex}/A_{c}) \times 100\%, \qquad (1)$$

где A<sub>ex</sub> и A<sub>c</sub> соответствуют значениям оптической плотности при 492 нм для экспериментального и контрольного образцов.

Для изучения ингибирующего действия IL-24, секретируемого МСК, на пролиферацию клетки H460 и MES обрабатывали КС от 3D-MCK, MCK-O и MCK-S в течение 24, 48 и 72 ч соответственно. Протокол MTT-анализа был такой же, как описано выше. Ингибирующую активность рассчитывали по формуле (1).

Анализ образования колоний. Чтобы выяснить. могут ли МСК ингибировать образование колоний клетками H460 и MES, мы провели соответствующий анализ. Клетки H460 и MES сначала высевали в 6-луночные планшеты по 10<sup>3</sup> клеток/лунка, обрабатывали полной средой HBMMSC или КС от 2D-МСК и 3D-МСК. Через 14 суток клетки дважды промывали PBS и фиксировали с помощью холодного метанола в течение 25 мин. В лунки вносили 1%-ный раствор кристаллического фиолетового ("Sangon Biotechnology", Китай) так, чтобы покрыть дно лунок, и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Раствор кристаллического фиолетового удаляли, а клетки дважды промывали ddH<sub>2</sub>O. Планшеты ставили вверх дном для просушки и далее помещали на специальную бумагу и подсчитывали число клеточных колоний.

Для изучения ингибирующего влияния IL-24, секретируемого MCK, на образование колоний клетками H460 и MES культуры обрабатывали KC от 3D-MCK, MCK-O и MCK-S в течение 14 суток. Для анализа образования колоний использовали вышеприведенный протокол.

Анализ миграции клеток. Для изучения ингибирующего влияния МСК на миграцию клеток Н460 и MES проведен соответствующий анализ. Клетки НМРЛ культивировали в 6-луночных планшетах до достижения конфлюентности 90-100% и наносили царапины с помощью стерильного наконечника для 200-микролитровой пипетки. Суспензионные клетки удаляли трехкратной промывкой PBS. К клеткам НМРЛ добавляли полную среду HBMMSC или КС от МСК. Заживление царапины наблюдали с помощью инвертированного микроскопа ("Nikon", Япония) через 0 и 24 ч после нанесения. Каждую группу клеток анализировали в трех повторах. Для измерения заживления повреждения использовали программное обеспечение Image J (https://imagej.net/, RRID: SCR 003070). Для расчета изменения площади царапины использовали следующую формулу:

$$\Delta S_{\rm w} = S_{\rm w0} - S_{\rm w24},\tag{2}$$

где  $S_{w0}$  и  $S_{w24}$  — средняя площадь царапины соответственно в 0 и 24 ч.

Способность КС от МСК ингибировать миграцию (IR<sub>m</sub>) клеток НМРЛ рассчитывали по следующей формуле:

$$IR_{m}(\%) = (1 - \Delta S_{ex} / \Delta S_{0}) \times 100\%,$$
 (3)

где  $\Delta S_{\rm ex}$  соответствует  $\Delta S_{\rm w}$  для экспериментальной группы, а  $\Delta S_0$  – для контрольной.

Для исследования ингибирующего действия IL-24, полученного из MCK, на миграцию клеток H460 и MES проводили еще один анализ миграции клеток с использованием вышеописанного протокола. После нанесения царпин к клеткам добавляли КС от 3D-МСК, МСК-О или МСК-S. Заживление ран наблюдали с помощью инвертированного микроскопа, фотографии делали через 0 и 24 ч после нанесения ран. Каждую группу клеток анализировали в трех повторах. Количественный анализ заживления ран и метод расчета изменения площади и ингибирующей способности описаны выше.

Анализ экспрессии генов рецепторов IL-24 в клетках H460 и MES методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Чтобы проверить, имеют ли клетки H460 и MES рецепторы к IL-24, PHK экстрагировали из клеток H460 и MES с помощью реагента TRIzol. Обратную транскрипцию для получения кДНК проводили с помощью Reverse Transcription Kit ("Promega", США). Для ПЦРамплификации использовали праймеры к генам *IL22RA1, IL20RA* и *IL20RB* (табл. 1). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле и фотографировали, используя ультрафиолетовую подсветку ("Alfa Innotech", США).

Анализ экспрессии *IL24* в клетках H460 и MES методом OT-ПЦР в реальном времени. Чтобы проанализировать, повышается ли экспрессия IL-24 в клетках H460 и MES после их стимуляции КС от MCK, из клеток H460 и MES экстрагировали PHK и синтезировали кДНК. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с помощью системы SLAN-96P ("Hongshitech", Китай) с использованием набора GO Taq® qPCR Master Mixture kit ("Promega"). Экспрессию гена *GAPDH* использовали в качестве внутреннего контроля для вычисления  $\Delta\Delta C_{T}$ . Последовательности праймеров приведены в табл. 2.

Иммуноблотинг. С целью проанализировать механизм ингибирующего действия МСК на раковые клетки НМРЛ мы исследовали в них экспрессию p38 МАРК и СХСR4/АКТ. Клетки НМРЛ обрабатывали полной средой НВММSС или КС от 2D-МСК, 3D-МСК, МСК-О или МСК-S в течение 48 ч. Клетки лизировали с использованием буфера для радиоиммунопреципитации (RIPA; "Beyotime", Китай), осветляли и готовили образцы для электрофореза, используя буфер для нанесения ("LABLEAD", Китай). После электрофореза в SDS-ПААГ белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану ("PALL"), используя технологию полусухого электропереноса, после чего мембрану инкубировали с 5%-ным сухим обезжиренным молоком для блокирования неспецифических сайтов связывания, а затем с первичными антителами (см. табл. 3) при 4°С в течение ночи. На следующий день мембрану промывали ( $6 \times 5$  мин) TBST, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 7.6, 150 мМ NaCl и 0.1% Tween 20, и инкубировали со вторичными антителами при комнатной температуре в темноте в течение 1 ч. Мембрану промывали TBST ( $5 \times 5$  мин), а для последней промывки использовали TBS. Интенсивность белковых полос оценивали с помощью программного обеспечения Image J (https://imagej.net/, RRID: SCR 003070).

Экспрессию IL-24 в клетках МСК, МСК-О и МСК-S определяли по той же методике, используя в качестве первичных специфичные к IL-24 антитела (табл. 3).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 ("La Jolla", США). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Двупарметрический *t*-критерий Стьюдента использовали для сравнения между двумя группами, а однофакторный ANOVA – для сравнения более чем двух групп. Все эксперименты были проведены не менее трех раз. Обозначения статистической значимости: ns (незначимое; p > 0.05), \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 и \*\*\*p < 0.001.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Ингибирующее действие 3D-MCK на пролиферацию клеток H460 и MES

Для изучения ингибирующего влияния MCK на пролиферацию клеточных линий H460 и MES раковые клетки культивировали в присутствии KC от MCK в течение 24, 48 и 72 ч. С помощью MTT-теста установлено, что KC от 2D- и 3D-MCK оказывали значительное ингибирующее действие на жизнеспособность клеток H460 и MES (\*p < 0.05) (рис. 1) через 24, 48 и 72 ч культивирования. Ингибирующая способность KC от 2D-MCK в отношении клеток H460 и MES составила 39.1 и 27.8% соответственно. По сравнению с 2D-MCK КC от 3D-MCK сильнее подавляла пролиферацию клеток H460 и MES, максимальная

Таблица 2. Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

Ген	Праймеры, 5' → 3'	Длина, п.н.	<i>Т</i> <sub>пл</sub> , °С	Число циклов
IL24	F: gtgatgaggagctgctttcg R: tctgctggctaaagtccaca	135	55	30
GAPDH	F: ccaaggagtaagacccctgg R: aggggagattcagtgtggtg	117	55	30

Кат. №	Антитела <sup>а</sup>	Разведение	Производитель
YP0338	Phospho-p38 MAPK (Thr180/Y182) Rabbit pAb	1:500	"Immunoway Biotechnology", США
YT3511	p38 MAPK Rabbit pAb	1:1000	"Immunoway Biotechnology"
YM3623	Bax Mouse mAb	1:1000	"Immunoway Biotechnology"
YP0917	Phospho-CXCR4 (Ser339) Rabbit pAb	1:500	"Immunoway Biotechnology"
YT1800	CXCR4 Rabbit pAb	1:1000	"Immunoway Biotechnology"
YP0006	Phospho-AKT (Ser473) Rabbit pAb	1:1000	"Immunoway Biotechnology"
YT0178	AKT Rabbit pAb	1:1000	"Immunoway Biotechnology"
YT0991	c-Myc Rabbit pAb	1:1000	"Immunoway Biotechnology"
YM3041	Bcl-2 Mouse mAb	1:1000	"Immunoway Biotechnology"
YT2798	MMP-2 Rabbit pAb	1:1000	"Immunoway Biotechnology"
AF1965	IL-24 Goat pAb	1:1000	"R&D Systems", США
926-32213	IRDye 680RD Donkey anti-Mouse Secondary Antibodies	1:20000	"LI-COR", США
926-68076	IRDye 680RD Donkey anti-Goat Secondary Antibodies	1:20000	"LI-COR"
926-68072	IRDye 800CW Donkey anti-Rabbit Secondary Antibodies	1:20000	"LI-COR"

Таблица 3. Антитела для иммуноблотинга

<sup>а</sup> pAb – поликлональные антитела; mAb – моноклональные антитела.

ингибирующая способность этой среды достигала 44.6% (рис. 1a) и 39.6% (рис. 16) через 48 ч.

Для дальнейшего подтверждения наличия ингибирующего влияния 2D- и 3D-MCK на пролиферацию клеток H460 и MES проанализировано образование колоний этими клетками в присутствии КС от 2D- или 3D-МСК. Выявлено, что способность к образованию колоний клетками H460 и MES выше в контрольной группе по сравнению с группами, получавшими КС от 2D- или 3D-MCK (рис. 1e, d). В то же время клетки MES обладали большей пролиферативной активностью, чем клетки Н460. Число клонов в группах 2D- и 3D-MCK было достоверно снижено (\* $p \approx$  $\approx 0.05$ ) по сравнению с контролем, а в группе 3D-MCК было ниже, чем в группе 2D-MCK (рис. 1e, e). На основании этих данных можно сделать вывод о том, что 3D-MCK обладают способностью ингибировать пролиферацию клеток H460 и MES по паракринному механизму.

# Ингибирующее действие 3D-MCK на миграцию клеток H460 и MES

С целью проверить супрессорное действие МСК на миграцию клеток НМРЛ мы провели соответствующий *in vitro* тест. Обнаружено, что скорость заживления царапин в монослое клеток MES и H460 в контрольной группе была выше, чем в группах, получавших КС от 2D- и 3D-MCK (рис. 2*a*, *б*), причем способность к миграции клеток MES была более выражена, чем клеток H460. Изменение площади царапины в группе, получавшей КС от 3D-MCK, было достоверно меньше, чем в группе, получавшей КС от 2D-MCK (\* $p \approx 0.05$ , рис. 2*в*, *д*), что соответствует более высокой ингибирующей активность 3D-MCK в отношении миграции клеток H460 и MES (\*p < 0.05): 46.73 и 45.93% соответственно (рис. 2*г*, *е*).

### Клетки H460 и MES экспрессируют рецепторы IL-24

Ранее по данным транскриптомного анализа нами обнаружено, что *IL24* относится к наиболее высокоэкспрессируемым генам в 3D-MCK по сравнению с 2D-MCK. Это наблюдение было подтверждено методами ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР в реальном времени и иммуноферментным анализом [18]. IL-24 — эффективный противоопухолевый цитокин, действие которого на опухолевые клетки опосредовано гетеродимерными рецепторами IL-24 (IL-20R1/IL-20R2 или IL-22R1/IL-20R2). С целью установить, экспрессируют ли клетки H460 и MES рецепторы IL-24, мы измерили содержание мРНК IL-22R1, IL-20R1, IL-20R2 в клетках H460 и MES, используя ОТ-ПЦР. Установлено, что рецепторы IL-24: IL-22R1 (продукт 481 п.о.) и IL-20R2 (продукт 406 п.о.) экспрессируются в клетках H460 и MES (рис. 3a,  $\delta$ ), тогда 648



**Рис. 1.** Подавление пролиферации клеток НМРЛ с помощью 2D- и 3D-MCK. По результатам МТТ-теста ингибирующая способность KC от 3D-MCK на клетки H460 (*a*) и MES (*b*) составляла 44.6 и 39.6% соответственно, что было достоверно выше, чем в группе 2D-MCK. Анализ образования колоний клетками H460 (*b*, *c*) и MES (*d*, *e*) показал, что число колоний клеток было значительно снижено в группах, получавших KC от 2D- и 3D-MCK, при этом эффект был более выражен в группе 3D-MCK.

как экспрессия IL-20R1 не обнаружена. Таким образом, эти результаты подтверждают возможность IL-24, секретируемого 3D-MCK, оказывать противоопухолевое действие на клетки НМРЛ.

### Получение МСК-О и МСК-S

Для дальнейшего исследования противоопухолевого действия IL-24 мы сконструировали плазмиду со сверхэкспресией *IL24* – pIRES2-EG-FP-IL-24 – путем клонирования гена *IL24* в вектор pIRES2-EGFP. Методом ОТ-ПЦР показано, что фрагмент *IL24* длиной 621 п.н., действительно встроен в pIRES2-EGFP (рис. 4*a*). Результаты рестриктазного анализа подтвердили наличие двух фрагментов: длиной 5300 и 621 п.н. (рис. 4*б*). Кроме того, заданная структура плазмиды подтверждена с помощью секвенирования. Полученными плазмидами для сверхэкспрессии и сайленсинга гена *IL24* (pIRES2-EGFP-IL-24 и pGPH1-GFP-IL24 соответственно) трансфицировали MCK. Отбор проводили путем добавления к клеткам G-418, затем среду дополняли EGF, IGF-1 и



**Рис. 2.** Подавление миграции клеток НМРЛ под действием 2D- и 3D-МСК. Первичные результаты заживления царапин в монослое клеток Н460 (*a*) и MES (*б*): изменение площади царапин (*e*, *d*); ингибирующая активность (*c*, *e*). Ингибирующая способность КС от 3D-МСК на миграцию клеток Н460 и MES достигла 46.73 и 45.93% соответственно, что было значительно выше, чем в группе 2D-МСК. Масштаб = 500 мкм.

б а NCI-H460 SK-MES-1 IL22RAI IL22RAI D12000 IL20RA IL20RA IL20RB IL20RB 2000 п.н. 2000 п.н. 1000 1000 750 750 500 500 250 250

**Рис. 3.** Экспрессия генов рецепторов IL-24 в клетках H460 и MES. Экспрессию генов рецепторов IL-24 в клетках H460 (*a*) и MES (*б*) оценивали методом ОТ-ПЦР. Оба типа клеток экспрессируют *IL22RA1* и *IL20RB*, тогда как экспрессия *IL20RA* не обнаружена. DL2000 – маркеры длины ДНК.

гидрокортизоном и культивировали клетки в течение 14 суток для получения поликлональных модифицированных МСК. МСК со сверхэкспрессией или сайленсинглом IL24 далее культивировали в 3D-формате для получения соответственно MCK-О и MCK-S. Зеленая флуоресценция клеток с избыточной или подавленной экспрессией *IL24* достигала 68 и 60% (рис. 4*в*). Иммуноблотингом показано, что экспрессия IL-24 в МСК-О значительно повышена, в то время как в MCK-S, наоборот, сильно снижена (рис.  $4\epsilon$ , d). Так, в результате проведенных экспериментов было доказано, что нами получены клетки с повышенной и пониженной экспрессиией IL-24 (МСК-О и МСК-S соответственно), которые можно использовать в лальнейшем.

### Сверхэкспрессия IL24 усиливала, а сайленсинг IL24 ослаблял ингибирующее действие MCK на пролиферацию клеток H460 и MES

Для выявления ингибирующего действия MCK-O и MCK-S на пролиферацию клетки H460 и MES обрабатывали KC от MCK-O и MCK-S в течение 24, 48 и 72 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью MTT-теста и затем рассчитывали эффективность ингибирования. Установлено, что KC от MCK-O по сравнению с 3D-MCK оказывала более сильное ингибирующее действие на клетки H460 и MES через 24, 48 и 72 ч (\*\*\*p < 0.001) (рис. 5a,  $\delta$ ). Ингибирующая активность увеличивалась с увеличением времени инкубации и через 72 ч достигала 53.0 и 45.6% для клеток H460 и MES соответственно. В то же время ингибирующий эффект KC от MCK-S на клетки H460 и MES был значительно снижен

через 24, 48 и 72 ч (\*\*\*p < 0.001), а самое высокое значение составляло только 12.8% через 72 ч и 14.0% через 48 ч соответственно.

Для подтверждения полученных результатов провели анализ образования колоний. Для клеток Н460 число клонов в группе, получавшей КС от МСК-О, было достоверно меньше, чем в группе 3D-MCK (\*\*\**p* < 0.001), в то время как в группе MCK-S было достоверно выше, чем в группе 3D-MCK (\*\*\**p* < 0.001) (рис. 5*в*, *г*). Для клеток MES результаты были сравнимы с таковыми для клеток Н460 (\*\*\**p* < 0.001) (рис. 5*д*, *e*). Кроме того, сравнивая число колоний, мы обнаружили, что клетки MES обладают более сильной способностью образовывать колонии, чем клетки Н460. На основании полученных результатов можно считать IL-24, секретируемый 3D-MCK, ключевым фактором, ингибирующим пролиферацию клеток H460 и MES.

### Сверхэкспрессия IL24 усиливала, а сайленсинг IL24 ослаблял ингибирующее действие MCK на миграцию клеток H460 и MES

Для изучения влияния MCK-O и MCK-S на миграцию H460 и MES клетки культивировали с KC от MCK-O и MCK- S, а затем на монослой клеток наносили царапины и наблюдали их закрытие. Обнаружено, что ингибирующее влияние MCK на миграцию клеток значительно усиливается при сверхэкспрессии *IL24* (рис. 6*a*,  $\delta$ ). По сравнению с группой 3D-MCK изменение площади царапины в группе MCK-O было достоверно снижено (\**p* ≈ 0.05) (рис. 6*e*,  $\delta$ ). Ингибирование миграции клеток H460 и MES через 24 ч после добавления KC от MCK-O увеличилось до 73.78 и



**Рис. 4.** Получение и анализ клеток со сверхэкспрессией и сайленсингом *IL24* (МСК-О и МСК-S соответственно). *а* – Анализ экспрессии *IL24* в плазмиде pIRES2-EGFP-IL-24 методом ОТ-ПЦР: дорожка *1* – экспрессия *IL24*; М – маркеры длины ДНК DL2000.  $\delta$  – Двойной рестрикционный анализ плазмиды pIRES2-EGFP-IL-24: дорожка *1* – продукты расщепления pIRES2-EGFP-IL-24 (5300 п.н. pIRES2-EGFP и 621 п.н. *IL24*); М – маркеры длина ДНК DL15000.  $\delta$  – Флуоресцентная микроскопия 3D-МСК-О и 3D-МСК-S, масштаб = 500 мкм. *е*,  $\partial$  – Подтверждение методом иммуноблотинга сверхэкспрессии и подавления экспрессии белка IL-24 в МСК-О и МСК-S соответственно.

60.68%, по сравнению с 46.73 и 45.93% в группах, получавших КС от 3D-МСК (рис. 6г, е). Напротив, ингибирование миграции клеток H460 и MES при добавлении КС от МСК-S снизилось до 4.60 и 14.57% соответственно. Таким образом, можно сделать вывод, что 3D-МСК ингибируют миграцию клеток H460 и MES за счет секреции IL-24. Сверхэкспрессия IL-24 может значительно усилить ингибирующую способность МСК, в то время как подавление продукции IL-24 может значительно ослабить этот эффект.

### IL-24, секретируемый МСК, перепрограммирует сигнальные пути p38 МАРК и СХСR4/АКТ в клетках H460 и MES

Для выяснения молекулярного механизма ингибирующего действия МСК на пролиферацию и миграцию раковых клеток мы провели анализ сигнальных путей IL-24 (рис. 7). По результатам иммуноблотинга, МСК не влияли на уровень экспрессии суммарного белка p38 МАРК в клетках H460 и MES. Однако по сравнению с группой 2D- МСК уровень фосфорилирования p38 МАРК был значительно выше в группах, получавших КС от 3D-МСК и МСК-О, и существенно снижен в группе, получавшей КС от МСК-S (рис. 7*a*-*в*). В обработанных МСК клетках НМРЛ проанализировали регулируемую IL-24 экспрессию генов *BAX* и *BCL2*. Обнаружено, что уровень проапоптотического белка Вах был повышен, в то время как содержание антиапоптотического белка Bcl-2 было снижено. Известно, что повышение соотношения Bax/Bcl-2 способствует апоптозу клеток, а, следовательно, и исследованных нами клеток НМРЛ.

Ранее Sauane и др. [23] показали, что экзогенный белок IL-24 стимулирует опухолевые клетки через рецепторы IL-24 и дополнительно стабилизирует эндогенную мРНК IL-24 в них. Для оценки изменений в уровнях эндогенной мРНК IL-24 в клетках H460 и MES их обрабатывали КС от 3D-MCK, а затем выделяли и анализировали РНК. Результаты количественной ОТ-ПЦР в реальном времени показали, что экспрессия эндогенной мРНК IL-24 в обработанных клетках H460 и MES



**Рис. 5.** Влияние МСК-О и МСК-S на пролиферацию клеток НМРЛ. По результатам МТТ-теста через 72 ч инкубации клеток H460 (*a*) и MES ( $\delta$ ) с КС от МСК-О их пролиферация снижалась на 53.0 и 45.6% соответственно, что было выше, чем для КС от немодифицированных МСК. Для КС от МСК-S максимальный ингибирующий эффект на пролиферацию клеток H460 и MES достигал только значений 12.8% через 72 ч и 14.0% через 48 ч соответственно, что было ниже, чем для КС от МСК. Анализ образования колоний клетками H460 (*a*, *e*) и MES ( $\partial$ , *e*) показал, что по сравнению с группой 3D-МСК число колоний клеток H460 и MES в группе МСК-О достоверно уменьшилось, в то время как в группе МСК-S достоверно увеличилось.

повышена по сравнению с контрольными клетками (рис. 7г). Этот молекулярный сигналинг приводит к супрессии пути CXCR4/AKT (рис. 7*д*-*ж*). Так, общее содержание белков CXCR4 и АКТ и их фосфорилированной формы в группе 3D-MCK было значительно снижено по сравнению с 2D-MCK. Также была снижена контролируемая CXCR4/AKT экспрессия белков, регулирующих пролиферацию (с-Мус) и миграцию (ММР2) клеток. В группе КС от МСК-О негативная регуляция этого сигнального пути была еще более усилена, тогда как в КС от МСК-Ѕ никакого изменения паттерна экспрессии практически не было. Таким образом, сигнальные пути р38 МАРК и СХСR4/АКТ вовлечены в ингибирующее действие IL-24 на злокачественный фенотип клеток H460 и MES (рис. 8).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021



**Рис. 6.** Влияние МСК-О и МСК-S на миграцию клеток НМРЛ. Первичные результаты заживления царапин в монослое клеток H460 (*a*) и MES (*б*) при добавлении КС от МСК-О и МСК-S: изменение площади царапины (*в*, *d*); ингибирующая активность (*e*, *e*). Заживление царапин в группе МСК-О происходило медленнее, чем в группе 3D-МСК через 24 ч, что свидетельствует о способности КС от МСК-О ингибировать миграцию клеток НМРЛ. Ингибирующая способность достигала 73.78 и 60.68% для клеток H460 и MES соответственно. В то же время подавление миграции клеток H460 и MES в группе МСК- S было снижено до 4.60 и 14.57% соответственно. Масштаб = 500 мкм.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021



**Рис.** 7. Влияние МСК на сигнальные пути p38 МАРК и СХСR4/АКТ в клетках НМРЛ. Иммуноблотинг компонентов сигнального пути p38 МАРК. Уровни фосфорилированной формы p38 МАРК (p-p38 МАРК) и ВАХ в клетках НМРЛ значительно повышались под действием КС от 3D-МСК или МСК-О по сравнению с контролем и 2D-МСК, в то время как в группе МСК-S этот эффект отсутствовал; содержание антиапоптотического белка Bcl-2 снижалось при добавлении КС от 3D-МСК или МСК-O, но не МСК-S (*a*). Относительная интенсивность полос белков, вовлеченных в сигнальный путь p38 МАРК, в клетках Н460 (*b*) и MES (*b*). По результатам ОТ-ПЦР в реальном времени относительный уровень мРНК IL-24 в клетках НМРЛ повышается при их обработке КС от 3D-МСК по сравнению с необработе танными клетками, уровень экспрессии этой мРНК в которых принят за 1 (*c*). По результатам иммуноблотинга содержание компонентов сигнального пути СХСR4/АКТ: p-СХСR4, сХСR4, p-АКТ, аКТ, с-Мус и ММР2 – в клетках H460 и MES снижалось при их обработке КС от 3D-МСК или МСК-O, но не мСК-S, или мСК-O, но не мСК-S (*\*p*  $\approx$  0.05) (*d*). Относительная интенсивность полос белков, вовлеченных в сигнальный путь СХСR4/АКТ, в клетках H460 (*e*) и MES (*\*p*).



**Рис. 8.** Механизмы ингибирующего действия 3D-MCK на клетки НМРЛ. IL-24, производимый 3D-MCK в качестве ключевого паракринного цитокина, через связывание с рецептором IL-22R1/IL-20R2 воздействует на сигнальные пути p38 MAPK и CXCR4/AKT и в результате приводит к изменениям в экспрессии белков, связанных с пролиферацией, апоптозом и миграцией.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

НМРЛ – это широко распространенное онкологическое заболевание, характеризующееся высокой смертностью, а его терапия представляет проблему для мировой системы здравоохранения [24]. В последние годы использование стволовых клеток лля лечения онкологических заболеваний привлекает все больше внимания, главным образом, благодаря их противоопухолевому действию, которое обусловлено либо секрецией противораковых факторов, либо возможностью выступать в роли нацеленных на опухоли средств доставки лекарственных препаратов [25-27]. Большинство известных до сих пор данных по противоопухолевому действию стволовых клеток было получено на 2D-культурах МСК. Хорошо известно, что культивирование МСК в 3D-формате лучше воспроизводит физиологическое состояние, наблюдаемое in vivo.

В представленной работе мы исследовали паракринное действие 3D-МСК на пролиферацию и миграцию клеток НМРЛ и выяснили молекулярный механизм этого процесса. Клетки Н460 и МЕЅ были выбраны в качестве репрезентативных клеток НМРЛ. Установлено, что 3D-МСК существенно ингибируют рост клеток НМРЛ: через 48 ч он замедлялся на 44.6 и 39.6% в клетках Н460 и МЕЅ соответственно; при этом ингибирующая способность 3D-МСК была достоверно выше, чем 2D-МСК (39.13 и 27.83% для Н460 и MES соответственно, \*\*p < 0.01). Интересно, что подавление пролиферации достигало максимума через 48 ч, а затем снижалось через 72 ч, что навело нас на мысль о том, что содержание цитокинов в КС может опосредовать изменение ингибирующей способности МСК. Вопрос о том, как продлить время жизни цитокинов в КС и поддерживать эффективное подавление роста опухоли, еще предстоит изучить.

Точно так же 3D-MCK оказывали заметное ингибирующее действие на образование колоний клетками H460 и MES; причем этот эффект был выражен значительно сильнее для 3D-MCK, чем для 2D-MCK (\*\*p < 0.01).

При анализе заживления царапин в монослое клеток обнаружено, что 3D-MCK существенно влияют на миграцию клеток H460 и MES. Их ингибирующая способность составила 46.73 и 45.93% соответственно, что было значительно выше, чем для 2D-MCK (31.39 и 17.53% соответственно, \*p < 0.05). Кроме того, мы наблюдали разницу в эффективности ингибирования миграции и пролиферации клеток H460 и MES. Клетки H460, повидимому, более чувствительны к КС от MCK, в то время как клетки MES более устойчивы.

Ген ассоциированного с дифференцировкой меланомы белка-7/интерлейкина-24 (*MDA7/IL24*) относится к противоопухолевым генам, белковый продукт которого ингибирует пролиферацию и миграцию раковых клеток без видимого влияния на нормальные клетки [28]. Ранее показано, что IL-24 ингибирует пролиферацию и способствует апоптозу во многих типах раковых клеток. Так, Chen и др. [29] сконструировали систему доставки на

основе раковых клеток, модифицированных комплексом ПЭГ/липид/фосфат кальция (PLC-cancer cell delivery system), для использования IL-24 в терапии рака. Pradhan и др. [30] продемонстрировали, что IL-24 снижает экспрессию miR-221 и опосредует специфическую гибель раковых клеток. Кроме того, IL-24 дает синергетический эффект с другими противоопухолевыми препаратами и лучевой терапией, что усиливает действие последних [31, 32]. Согласно данным транскриптомного анализа, проведенного в нашей группе, уровень экспрессии IL-24 в 3D-MCK значительно выше, чем в 2D-MCK [18]. Теперь нами выявлена экспрессия и рецепторов IL-24: IL-22R1/IL-20R2, — как в клетках H460, так и MES.

В связи с этим мы сосредоточились на IL-24, продуцируемом МСК, и предположили, что он играет ключевую роль в ингибировании опухоли. С целью подтвердить или опровергнуть эту гипотезу мы сконструировали системы МСК-О и MCK-S – соответственно с избыточной и подавленной экспрессией гена IL24. Как мы и ожидали, ингибирование пролиферации и миграции клеток НМРЛ при использовании КС от МСК-О резко возросло по сравнению с немодифицированными МСК. Ингибирование пролиферации клеток Н460 увеличилось с 44.6 до 53.0%, а в случае MES – с 39.6 до 45.6%, причем в обоих случаях эффект зависел от времени инкубации в течение 72 ч. Это может быть связано с длительностью воздействия высокой концентрации IL-24, содержащейся в КС. В то же время при использовании МСК-Ѕ ингибирование пролиферации и миграции, наоборот, заметно снижалось в течение 72 ч. Эти данные позволяют предположить, что IL-24 относится к важным секреторным факторам 3D-MCK, который супрессирует пролиферацию и миграцию клеток НМРЛ. Кроме того, в ходе проведенных экспериментов выявлено невысокое ингибирующее действие МСК-S – с сайленсингом экспрессии IL24. Это может быть связано с тем, что МСК секретируют и другие цитокины, способные ингибировать рост клеток H460 и MES. В ряде исследований показано, что МСК секретируют различные цитокины и микровезикулы, нацеленные на опухолевые клетки: IL-1Ra [33], VEGF-A [7], микроРНК-145 [34]. Таким образом, функциональные связи между различными факторами, секретируемыми МСК, еще предстоит выявить в дальнейших исследованиях.

IL-24 ингибирует рост опухоли, используя различные механизмы. В нескольких исследованиях показано, что экзогенный IL-24 в опухолевых клетках индуцирует повышение экспрессии *IL24* на транскрипционном уровне [23] и в дальнейшем вызывает изменения в сигнальном пути CXCR4/AKT [35]. Хемокиновый рецептор CXCR4, специфический рецептор хемокинового стромального клеточного фактора-1 (CXCL12),

участвует во многих физиологических процессах, включая метастазирование опухолей, кроветворение, эмбриональное развитие и ВИЧ-инфекцию [36-39]. В представленной работе нами выявлены изменения в экспрессии ключевых белков сигнального пути CXCR4/AKT, связанных с пролиферацией и миграцией. Установлено, что уровни как общего белка, так и фосфорилированных форм CXCR4 и AKT значительно снижались под действием КС от МСК, что приводило к пониженной экспрессии ассоциированного с пролиферацией клеток белка с-Мус и связанной с миграцией матриксной металлопротеиназы-2 (ММР2). Изменения в уровнях этих белков гораздо сильнее выражено в группе 3D-MCK, чем 2D-MCK. Более того, использование МСК-О усиливало эти эффекты, тогда как MCK-S наоборот предотвращало изменения в этом сигнальном пути. Известно, что сигнальный путь р38 МАРК играет важную роль в передаче сигнала от рецептора IL-24, индуцируя апоптоз опухолевых клеток [40]. Таким образом, выявленные нами изменения в vровне экспрессии ключевых белков сигнального пути p38 MAPK тесно связаны с IL-24. На основании результатов иммуноблотинга можно сделать вывод, что IL-24 из МСК позитивно регулирует фосфорилирование р38 МАРК в клетках H460 и MES, но не оказывает влияния на общий уровень белка. В то же время экспрессия апоптотического белка Вах усиливалась, тогда как экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 снижалась, что приводило к повышению соотношения Bax/Bcl-2 в клетках НМРЛ. Интересно, что IL-24, продуцируемый 3D-MCK, способен не только ингибировать пролиферацию и миграцию клеток H460 и MES, но и стимулировать их апоптоз. Основываясь на этих данных, мы предполагаем, что наблюдаемое нами ингибирование пролиферации клеток НМРЛ под действием 3D-MCK может быть опосредовано усилением апоптоза, хотя для подтверждения или опровержения этой гипотезы необходимо провести детальные исследования. В связи с этим важным представляется дальнейшее изучение эффектов IL-24, секретируемого МСК в 3D-культуре, на клетки H460 и MES; это влияние на апоптоз, аутофагию, антиангиогенез и иммунную регуляцию [22, 40-42]. Необходимо установить, для каких из этих путей наблюдается активация, а для каких ослабление. Кроме того, для подтверждения выявленных для IL-24 эффектов необходимо провести эксперименты с IL-24, непосредственно введенным в среду культивирования, а также с антителом к IL-24 – для подтверждения отмены IL-24-индуцированного эффекта. Экзогенное введение IL-24 и специфичного к нему антитела позволит дополнительно изучить действие IL-24. Также использование антител к рецептору IL-24 (IL-22R1/IL-20R2) позволит дополнительно прояснить и подтвердить механизм

передачи сигнала от IL-24. В настоящее время считают, что IL-24 может изменять микроокружение опухоли, ингибировать рост опухоли и создавать внеклеточную среду, способствующую ее эрадикации [43]. Однако ответ на вопрос, как действует IL-24 на раковые клетки: непосредственно через рецепторы на опухолевых клетках, или опосредованно, через регуляцию иммунных клеток, или задействует оба механизма одновременно, — лежит в сфере дальнейших исследований.

Таким образом, нами показано, что 3D-MCK оказывают значительное ингибирующее действие на пролиферацию и миграцию клеток H460 и MES, а IL-24, продуцируемый 3D-MCK, — ключевой фактор этого процесса, действующий через сигнальные пути p38 MAPK и CXCR4/AKT. Мы надеемся, что это исследование будет способствовать разработке новых методов лечения онкологических заболеваний — на основе мезенхимальных стволовых клеток.

Работа была поддержана Национальным фондом естественных наук Китая (National Natural Science Foundation of China; No 81201762).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. (2019) Cancer statistics, 2019. CA Cancer J. Clin. 69, 7–34.
- Wu Z., Qiu X., Gao B., Lian C., Peng Y., Liang A., Xu C., Gao W., Zhang L., Su P., Rong L., Huang D. (2018) Melatonin-mediated miR-526b-3p and miR-590-5p upregulation promotes chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Pineal. Res.* 65, e12483.
- Camorani S., Hill B.S., Fontanella R., Greco A., Gramanzini M., Auletta L., Gargiulo S., Albanese S., Lucarelli E., Cerchia L., Zannetti A. (2017) Inhibition of bone marrow-derived mesenchymal stem cells homing towards triple-negative breast cancer microenvironment using an anti-PDGFRβ aptamer. *Theranostics.* 7, 3595–3607.
- 4. Kupcova Skalnikova H. (2013) Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*. **95**, 2196–2211.
- Li L., Tian H., Chen Z., Yue W., Li S., Li W. (2011) Inhibition of lung cancer cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (Shanghai). 43, 143–148.
- Jung P.Y., Ryu H., Rhee K.J., Hwang S., Lee C.G., Gwon S.Y., Kim J., Kim J., Yoo B.S., Baik S.K., Bae K.S., Eom Y.W. (2019) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN-β and

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

TRAIL and suppress the growth of H460 human lung cancer cells. *Cancer Lett.* **440–441**, 202–210.

- Pan M., Hou L., Zhang J., Zhao D., Hua J., Wang Z., He J., Jiang H., Hu H., Zhang L. (2018) Inhibitory effect and molecular mechanism of mesenchymal stem cells on NSCLC cells. *Mol. Cell. Biochem.* 441, 63–76.
- Fakiruddin K.S., Lim M.N., Nordin N., Rosli R., Zakaria Z., Abdullah S. (2019) Targeting of CD133<sup>+</sup> cancer stem cells by mesenchymal stem cell expressing TRAIL reveals a prospective role of apoptotic gene regulation in non-small cell lung cancer. *Cancers* (Basel). 11, 1261.
- Kim S.W., Lee Y.K., Hong J.H., Park J.Y., Choi Y.A., Lee D.U., Choi J., Sym S.J., Kim S.H., Khang D. (2018) Mutual destruction of deep lung tumor tissues by nanodrug-conjugated stealth mesenchymal stem cells. *Adv. Sci.* (Weinh.). 5, 1700860.
- Gazdic M., Simovic Markovic B., Jovicic N., Misirkic-Marjanovic M., Djonov V., Jakovljevic V., Arsenijevic N., Lukic M.L., Volarevic V. (2017) Mesenchymal stem cells promote metastasis of lung cancer cells by downregulating systemic antitumor immune response. *Stem Cells Int.* 2017, 6294717.
- Wang S., Li X., Xu M., Wang J., Zhao R.C. (2017) Reduced adipogenesis after lung tumor exosomes priming in human mesenchymal stem cells via TGFβ signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 435, 59–66.
- Luo D., Hu S., Tang C., Liu G. (2018) Mesenchymal stem cells promote cell invasion and migration and autophagy-induced epithelial-mesenchymal transition in A549 lung adenocarcinoma cells. *Cell Biochem. Funct.* 36, 88–94.
- Fregni G., Quinodoz M., Moller E., Vuille J., Galland S., Fusco C., Martin P., Letovanec I., Provero P., Rivolta C., Riggi N., Stamenkovic I. (2018) Reciprocal modulation of mesenchymal stem cells and tumor cells promotes lung cancer metastasis. *EBioMedicine*. 29, 128–145.
- 14. Caliari S.R., Burdick J.A. (2016) A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat. Methods.* **13**, 405–414.
- DeVolder R., Kong H.J. (2012) Hydrogels for *in vivo*like three-dimensional cellular studies. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 4, 351–365.
- Legant W.R., Chen C.S., Vogel V. (2012) Force-induced fibronectin assembly and matrix remodeling in a 3D microtissue model of tissue morphogenesis. *Integr. Biol.* (Camb.). 4, 1164–1174.
- Ravi M., Paramesh V., Kaviya S.R., Anuradha E., Solomon F.D. (2015) 3D cell culture systems: advantages and applications. *J. Cell. Physiol.* 230, 16–26.
- Zhao D., Hou L., Pan M., Hua J., Wang Z., He J., Hu H. (2018) Inhibitory effect and mechanism of mesenchymal stem cells cultured in 3D system on hepatoma cells HepG2. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 184, 212–227.
- Chaudhuri O., Gu L., Klumpers D., Darnell M., Bencherif S.A., Weaver J.C., Huebsch N., Lee H.P., Lippens E., Duda G.N., Mooney D.J. (2016) Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. *Nat. Mater.* 15, 326–334.

- Pradhan A.K., Bhoopathi P., Talukdar S., Scheunemann D., Sarkar D., Cavenee W.K., Das S.K., Emdad L., Fisher P.B. (2019) MDA-7/IL-24 regulates the miRNA processing enzyme DICER through downregulation of MITF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 116, 5687–5692.
- Bhutia S.K., Das S.K., Azab B., Menezes M.E., Dent P., Wang X.Y., Sarkar D., Fisher P.B. (2013) Targeting breast cancer-initiating/stem cells with melanoma differentiation-associated gene-7/interleukin-24. *Int. J. Cancer.* 133, 2726–2736.
- Sarkar D., Su Z.Z., Lebedeva I.V., Sauane M., Gopalkrishnan R.V., Valerie K., Dent P., Fisher P.B. (2002) *mda*-7 (IL-24) mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 10054–10059.
- Sauane M., Su Z.Z., Gupta P., Lebedeva I.V., Dent P., Sarkar D., Fisher P.B. (2008) Autocrine regulation of *mda*-7/IL-24 mediates cancer-specific apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105, 9763–9768.
- Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. (2015) Global cancer statistics, (2012) *CA Cancer J. Clin.* 65, 87–108.
- Kang S., Bhang S.H., Hwang S., Yoon J.K., Song J., Jang H.K., Kim S., Kim B.S. (2015) Mesenchymal stem cells aggregate and deliver gold nanoparticles to tumors for photothermal therapy. *ACS Nano.* 9, 9678–9690.
- Shen W.C., Lai Y.C., Li L.H., Liao K., Lai H.C., Kao S.Y., Wang J., Chuong C.M., Hung S.C. (2019) Methylation and PTEN activation in dental pulp mesenchymal stem cells promotes osteogenesis and reduces oncogenesis. *Nat. Commun.* 10, 2226.
- Xu C., Lin L., Cao G., Chen Q., Shou P., Huang Y., Han Y., Wang Y., Shi Y. (2014) Interferon-α-secreting mesenchymal stem cells exert potent antitumor effect *in vivo. Oncogene.* 33, 5047–5052.
- Ma Q., Jin B., Zhang Y., Shi Y., Zhang C., Luo D., Wang P., Duan C., Song H., Li X., Deng X., Chen Z., Wang Z., Jiang H., Liu Y. (2016) Secreted recombinant human IL-24 protein inhibits the proliferation of esophageal squamous cell carcinoma Eca-109 cells *in vitro* and *in vivo*. Oncol. Rep. 35, 2681–2690.
- Chen J., Gao P., Yuan S., Li R., Ni A., Chu L., Ding L., Sun Y., Liu X.Y., Duan Y. (2016) Oncolytic adenovirus complexes coated with lipids and calcium phosphate for cancer gene therapy. *ACS Nano.* 10, 11548–11560.
- Pradhan A.K., Talukdar S., Bhoopathi P., Shen X.N., Emdad L., Das S.K., Sarkar D., Fisher P.B. (2017) *mda*-7/IL-24 mediates cancer cell-specific death via regulation of miR-221 and the Beclin-1 axis. *Cancer Res.* 77, 949–959.
- 31. Dash R., Azab B., Quinn B.A., Shen X., Wang X.Y., Das S.K., Rahmani M., Wei J., Hedvat M., Dent P., Dmitriev I.P., Curiel D.T., Grant S., Wu B., Stebbins J.L., Pellecchia M., Reed J.C., Sarkar D., Fisher P.B. (2011) Apogossypol derivative BI-97C1 (Sabutoclax) targeting Mcl-1 sensitizes prostate cancer cells to mda-7/IL-24-

mediated toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108, 8785-8790.

- Zhao Y., Li Z., Sheng W., Miao J., Yang J. (2013) Radiosensitivity by ING4-IL-24 bicistronic adenovirusmediated gene cotransfer on human breast cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 20, 38–45.
- Zhang J., Hou L., Zhao D., Pan M., Wang Z., Hu H., He J. (2017) Inhibitory effect and mechanism of mesenchymal stem cells on melanoma cells. *Clin. Transl. Oncol.* 19, 1358–1374.
- 34. Takahara K., Ii M., Inamoto T., Nakagawa T., Ibuki N., Yoshikawa Y., Tsujino T., Uchimoto T., Saito K., Takai T., Tanda N., Minami K., Uehara H., Komura K., Hirano H., Nomi H., Kiyama S., Asahi M., Azuma H. (2016) microRNA-145 mediates the inhibitory effect of adipose tissue-derived stromal cells on prostate cancer. *Stem. Cells Dev.* 25, 1290–1298.
- 35. Panneerselvam J., Jin J., Shanker M., Lauderdale J., Bates J., Wang Q., Zhao Y.D., Archibald S.J., Hubin T.J., Ramesh R. (2015) IL-24 inhibits lung cancer cell migration and invasion by disrupting the SDF-1/CXCR4 signaling axis. *PLoS One*. **10**, e0122439.
- Moro M., Bertolini G., Pastorino U., Roz L., Sozzi G. (2015) Combination treatment with all-trans retinoic acid prevents cisplatin-induced enrichment of CD133<sup>+</sup> tumor-initiating cells and reveals heterogeneity of cancer stem cell compartment in lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 10, 1027–1036.
- Teng F., Tian W.Y., Wang Y.M., Zhang Y.F., Guo F., Zhao J., Gao C., Xue F.X. (2016) Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. J. Hematol. Oncol. 9, 8.
- Tsou L.K., Huang Y.H., Song J.S., Ke Y.Y., Huang J.K., Shia K.S. (2018) Harnessing CXCR4 antagonists in stem cell mobilization, HIV infection, ischemic diseases, and oncology. *Med. Res. Rev.* 38, 1188–1234.
- 39. Xu J., Liang J., Meng Y.M., Yan J., Yu X.J., Liu C.Q., Xu L., Zhuang S.M., Zheng L. (2017) Vascular CXCR4 expression promotes vessel sprouting and sensitivity to sorafenib treatment in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 23, 4482–4492.
- Dash R., Bhoopathi P., Das S.K., Sarkar S., Emdad L., Dasgupta S., Sarkar D., Fisher P.B. (2014) Novel mechanism of MDA-7/IL-24 cancer-specific apoptosis through SARI induction. *Cancer Res.* 74, 563–574.
- Fan S., Gao H., Ji W., Zhu F., Sun L., Liu Y., Zhang S., Xu Y., Yan Y., Gao Y. (2020) Umbilical cord-derived mesenchymal stromal/stem cells expressing IL-24 induce apoptosis in gliomas. *J. Cell Physiol.* 235, 1769–1779.
- Ma M., Zhao L., Sun G., Zhang C., Liu L., Du Y., Yang X., Shan B. (2016) Mda-7/IL-24 enhances sensitivity of B cell lymphoma to chemotherapy drugs. *Oncol. Rep.* 35, 3122–3130.
- 43. Ma Y.F., Ren Y., Wu C.J., Zhao X.H., Xu H., Wu D.Z., Xu J., Zhang X.L., Ji Y. (2016) Interleukin (IL)-24 transforms the tumor microenvironment and induces anticancer immunity in a murine model of colon cancer. *Mol. Immunol.* **75**, 11–20.

# MESENCHYMAL STEM CELLS CULTURED IN 3D SYSTEM INHIBIT NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS THROUGH p38 MAPK AND CXCR4/AKT PATHWAYS BY IL-24 REGULATING

### F. Suo<sup>1</sup>, M. Pan<sup>1</sup>, Y. Li<sup>1</sup>, Q. Yan<sup>1</sup>, H. Hu<sup>1</sup>, and L. Hou<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences and Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing, 100044 PR China \*e-mail: llhou@bjtu.edu.cn

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is prevalent worldwide and has a high mortality rate. Even if mesenchymal stem cells (MSCs) are suggested as cancer treatment, the studies of their effects on NSCLC cells contradict each other, mainly due to utilization of two-dimensional (2D) culture system. Three-dimensional (3D) culture systems resemble tissue organization *in vivo*. Here we comprehensively explore the inhibitory effects of MSCs on NSCLC cells in a 3D culture system. We confirmed that the inhibitory effects of 3D-cultured MSCs (3D-MSCs) on the proliferation and migration of NSCLC cells are greater than that of the 2D-cultured MSCs. 3D-MSCs overexpress IL-24, which serve as the key factor enhancing antitumor effects of MSCs. In these cells, IL-24 affects p38 MAPK and CXCR4/AKT pathways. Overall, this study provides the support for use of MSCs in tumor therapy.

Keywords: mesenchymal stem cells, three-dimensional cell culture, interleukin-24, tumor inhibition, NSCLC

### МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 577.25

# СНИЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ СТРИАТУМСПЕЦИФИЧНОЙ ПРОТЕИН-ТИРОЗИН-ФОСФАТАЗЫ (STEP) В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ Danio rerio ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ *n*-ХЛОРФЕНИЛАЛАНИНА И ПАРГИЛИНА

© 2021 г. Е. А. Куликова<sup>*a*, \*</sup>, Д. В. Фурсенко<sup>*a*</sup>, Е. Ю. Баженова<sup>*a*</sup>, А. В. Куликов<sup>*a*</sup>

<sup>а</sup>Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия \*e-mail: lisa kulikova@ngs.ru, kulikova@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 03.07.2020 г. После доработки 18.09.2020 г. Принята к публикации 01.10.2020 г.

Фундаментальные нейрофизиологические процессы часто изучают с использованием рыбы Danio rerio в качестве модели. Ранее было показано, что селективный ингибитор стриатумспецифичной протеин-тирозин-фосфатазы (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase, STEP) снижает метаболизм серотонина в головном мозге D. rerio. Как STEP, так и серотонин участвуют в развитии нейродегенеративных нарушений поведения. Снижение или повышение уровня серотонина в головном мозге мышей, вызванное введением *n*-хлорфенилаланина или паргилина, соответственно, приводит к снижению в стриатуме уровня мРНК гена *ptpn5*, кодирующего STEP. Однако не установлено, наблюдается ли это и у других организмов. Нами изучено влияние ингибиторов синтеза (л-хлорфенилаланин) и деградации (паргилин) серотонина на экспрессию гена ptpn5 и активность STEP в головном мозге D. rerio. Рыбок помещали на 72 ч в воду, содержащую n-хлорфенилаланин (2 мг/л) или паргилин (0.5 мг/л), контрольные особи находились в аквариумной воде. Обработка *n*-хлорфенилаланином снижала уровень серотонина в мозгу в 4 раза, тогда как паргилин увеличивал уровень этого медиатора в 6 раз. Как *n*-хлорфенилаланин, так и паргилин снижают активность STEP в головном мозге D. rerio, не влияя при этом на уровень мРНК гена ptpn5. Таким образом, взаимодействие между STEP и серотониновой системой наблюдается не только у млекопитающих, но и у рыб, что указывает на сходство процесса регуляции у позвоночных.

Ключевые слова: *Danio rerio*, стриатумспецифичная протеин-тирозин-фосфатаза, STEP, *ptpn5*, ферментативная активность, экспрессия генов, серотонин, мозг, рыбы, *n*-хлорфенилаланин, паргилин **DOI:** 10.31857/S0026898421030113

### введение

Аквариумная рыбка *Danio rerio* (*D. rerio*) служит удобной моделью для изучения процессов, протекающих в мозге [1, 2]. Морфология центральной нервной системы у рыб и млекопитающих, в том числе и человека, сходна, поэтому *D. rerio* активно используют при исследовании молекулярных процессов, лежащих в основе развития нейродегенеративных заболеваний.

Белки, регулирующие передачу сигналов в клетке, включая стриатумспецифичную протеинтирозин-фосфатазу (STriatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase, STEP), принимают участие в патологических процессах в головном мозге. Фермент STEP дефосфорилирует остатки тирозина, регулируя таким образом активность киназ ERK 1/2, p38 [3], Fyn [4], Pyk2 [5], а также субъединиц рецепторов NMDA и AMPA, участвующих в важных сигнальных каскадах в клетке [6]. STEP экспрессируется преимущественно в нейронах. Изменения активности этого фермента наблюдаются при целом ряде нейродегенеративных заболеваний [3]. У рыб белок STEP кодируется геном *ptpn5*, расположенным на хромосоме 7. Обработка *D. rerio* гидрохлоридом 8-трифторметил-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амина (TC-2153), который селективно ингибирует STEP, приводит к снижению метаболизма серотонина в мозге [7]. Более того, показано взаимодействие STEP и серотониновой системы в мозге млекопитающих [8–10].

Сокращения: 5-НТ – серотонин; *ptpn5* – ген, кодирующий белок STEP; pol2e – ДНК-зависимая PHK-полимераза; STEP (STriatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase) – стриатумспецифичная протеин-тирозин-фосфатаза; МАО – моноаминок-сидаза; ТПГ2 – триптофангидроксилаза 2.

Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) – один из ключевых нейромедиаторов головного мозга, изменение уровня которого, как и STEP, ассоциировано с развитием многих психопатологий [11, 12]. В мозге млекопитающих 5-НТ синтезируется из *L*-триптофана с участием триптофангидроксилазы 2 (ТПГ2) [13–15]. Известно, что ингибитор ТПГ2 – *n*-хлорфенилаланин, снижает уровень 5-НТ в мозге [16]. Главную роль в катаболизме 5-НТ млекопитающих играют моноаминоксидазы (МАО) А и Б, локализованные на внешней мембране митохондрий [17]. Введение ингибитора МАО, паргилина, приводит к увеличению уровня 5-НТ в мозге [18, 19].

Как показано ранее и снижение, и повышение уровня 5-НТ, вызванное введением n-хлорфенилаланина и паргилина, соответственно, снижает уровень мРНК гена *ptpn5* в стриатуме мышей [20]. Однако не установлено, сохраняется ли это взаимодействие и у других позвоночных.

Мы исследовали влияние фармакологического снижения и повышения концентрации 5-НТ на уровень мРНК гена *ptpn5* и активность белка STEP в головном мозге *D. rerio*.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Животные и воздействия.** Исследование проведено на взрослых (3–4 мес.) самцах и самках леопардовых *D. rerio*, взятых в соотношении 1 : 1 (всего 81 особь). Рыбы получены в Секторе генетических коллекций нейропатологий ИЦиГ СО РАН и с возраста 1 мес. содержались в аквариуме (200 л, 27°С) при непрерывной фильтрации, аэрации и фотопериоде 14 ч свет и 10 ч темнота. Рыб кормили 2 раза в день сухим кормом Tetramin Tropical Flakes ("Tetra", США) и 2 раза в неделю замороженными *Chironomus plumosus*. Исследование проведено согласно руководству по работе с *D. rerio* Национального института здоровья США (NIH) от 12 апреля 2013 года. Протокол исследования одобрен Комитетом по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

Рыбы были разделены на три группы: контроль, *n*-хлорфенилаланин и паргилин (по 27 особей в каждой) и в течение 72 ч содержались в 9 аквариумах объемом 4 л по 9 особей каждой группы. Контрольных животных содержали в чистой аквариумной воде, экспериментальные группы на-

ходились в воде с добавлением 2 мг/л *n*-хлорфенилаланина или 0.5 мг/л паргилина. Воду и препараты меняли 1 раз в сутки. Дозы препаратов подобраны в предварительных экспериментах. Для уменьшения стресса, связанного с отловом, рыб за 20 мин до забоя помещали в пластиковые емкости объемом 0.5 л, содержащие растворы соответствующих препаратов. Эвтаназию проводили, помещая рыб в холодную воду  $(+2^{\circ}C)$ , выделяли головной мозг. замораживали его в жидком азоте и хранили при -80°С до проведения молекулярно-биохимических исследований. Образцы мозга (27 от каждой группы) разделяли произвольным образом на три партии по 9 образцов в каждой для определения уровня 5-НТ, экспрессии гена *ptpn5* и активности STEP.

Определение уровня 5-НТ. Головной мозг одной особи гомогенизировали в 150 мкл 0.6 М HClO<sub>4</sub> и центрифугировали в течение 20 мин при 12700 об./мин (+4°С). Полученный супернатант использовали для определения уровня 5-НТ с помощью жидкостного хроматографа ("Shimadzu Corporation", США) с электрохимическим детектором DECADE II<sup>™</sup> ("Antec", Нидерланды) согласно [21], а осадок использовали для определения концентрации общего белка в пробе по Брэдфорду ("BioRad", США) согласно протоколу производителя. Концентрацию 5-НТ в пробе определяли по площади пика с помощью программы LabSolution LG/GC ("Shimadzu Corporation") и нормировали по калибровочной кривой, полученной с использованием стандартов 1, 2 и 3 нг для 5-НТ [21]. Содержание 5-НТ выражали в нг/мг белка.

Выделение РНК и проведение ОТ-ПЦР. Мозг рыбы гомогенизировали в 300 мкл Trizol Reagent ("Ambion, Life Technologies", США), суммарную РНК выделяли согласно протоколу производителя. Следы геномной ДНК удаляли, используя ДНКазу, свободную от РНКазы ("Promega", США). кДНК синтезировали с помощью набора R01-250 ("Биолабмикс", Россия) согласно протоколу производителя. Концентрацию мРНК искомых генов определяли методом количественной ОТ-ПЦР с помощью наборов R-402 ("Синтол", Россия) и специфически подобранных праймеров (табл. 1), согласно следующему протоколу: 95°С, 4 мин, затем 40 циклов 95°С, 15 с; 57°С, 30 с; 72°С, 20 с. Уровень экспрессии оценивали с использовани-

Ген	Праймер	$T_{\Pi\Pi}$	Длина ампликона, п.н.	Эффективность
ptpn5	F 5'-ATGTGTCTCTGACGTTGGACAT-3'	57	116	$1.747 \pm 0.036$
	R 5'-CAGCAGGTTGGATGCGTTCT-3'	57	110	
polr2e	F 5'-GTGACGCAGGATGAATTGGA-3'	57	105	$1.946 \pm 0.063$
	R 5'-CACCAGGACTGTCAGGTCATTT-3'	57	105	

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в количественной ОТ ПЦР в реальном времени



**Рис. 1.** Уровень 5-НТ (нг/мг белка) в головном мозге *D. rerio* после выдерживания в течение 72 ч в воде (контроль) и растворах 2 мг/л *n*-хлорфенилаланина или 0.5 мг/л паргилина. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 по сравнению с контролем.

ем калибровочной кривой, построенной по геномной ДНК известной концентрации [22], выделенной из мышц хвоста *D. rerio*, и нормировали на 100 копий гена домашнего хозяйства *polr2e*.

Определение обшей фосфатазной активности и STEP в головном мозге D. rerio. Выделенный мозг гомогенизировали в 150 мкл 50 мМ MES (2-(Nморфолино)-этансульфоновая кислота) буфере рН 7.0 и центрифугировали в течение 20 мин при 12700 об./мин (+4°С). Общее количество белка в супернатанте определяли по методу Брэдфорда ("BioRad") согласно протоколу производителя. Реакцию дефосфорилирования п-нитрофенилфосфата с образованием окрашенного 4-нитрофенола проводили в аналитическом планшете Costar при 25°С на спектрофотометре Multiscan GO ("ThermoFisher") и длине волны 405 нм. Реакционная смесь для определения общей фосфатазной активности состояла из супернатанта, разведенного в 50 мМ MES-буфере рН 7.0 до концентрации белка 0.5-1.5 мкг/мкл, и раствора *n*-нитрофенилфосфата в MES. Активность STEP вычисляли с использованием разработанной нами методики [20], основанной на упомянутой ферментативной реакции и регулируемой с помощью селективного ингибитора белка STEP – вещества TC-2153 (НИОХ СО РАН, Россия). В качестве стандартов для построения калибровочной кривой использовали растворы 4-нитрофенола известной концентрации. Активность выражали в ниолях 4-нитрофенола на миллиграмм общего белка в минуту (нмоль/мг/мин) [20].

Статистика. Результаты представляли как среднее ± ошибка среднего и анализировали с помощью однофакторного метода ANOVA. Сравне-



**Рис. 2.** Относительный уровень мРНК гена *ptpn5* (на 100 копий мРНК *polr2e*) в головном мозге *D. rerio* после содержания в течение 72 ч в воде (контроль) и растворах *n*-хлорфенилаланина (2 мг/л) или паргилина (0.5 мг/л).

ние *post hoc* проводили по Фишеру. Уровень значимости принят равным 0.05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние п-хлорфенилаланина и паргилина на уровень 5-НТ в головном мозге рыб D. rerio

Нами выявлены значимые эффекты препаратов на уровень 5-НТ ( $F_{2,24} = 252.5, p < 0.001$ ) в мозге *D. rerio*. Выдерживание *D. rerio* в течение 72 ч в воде, содержащей 2 мг/л ингибитора ТПГ2 (*n*-хлорфенилаланина) значительно снизило уровень 5-НТ в мозге (до 26% от значений в контроле, p = 0.034). Тогда как содержание в течение 72 ч в воде с 0.5 мг/л ингибитора МАО (паргилина) значительно повысило уровень 5-НТ (696% по сравнению с контролем, p < 0.001) (рис. 1). Таким образом, выбранные нами концентрации препаратов и способ обработки животных существенно изменяют уровень 5-НТ в мозге *D. rerio*.

### Влияние п-хлорфенилаланина и паргилина на уровень мРНК гена ptpn5 в головном мозге D. rerio

Содержание рыб в течение 72 ч в воде с 2 мг/л *n*-хлорфенилаланина или 0.5 мг/л паргилина не привело к изменению уровня мРНК гена *ptpn5* в мозге по сравнению с контролем ( $F_{2,24} < 1$ ) (рис. 2).

### Влияние п-хлорфенилаланина и паргилина на общую активность фосфатаз и отдельно STEP в головном мозге D. rerio

Выявлено значимое влияние обоих препаратов на общую активность всех фосфатаз ( $F_{2,24} = 12.6, p < < 0.001$ ) и на активность STEP ( $F_{2,24} = 4.72, p < 0.05$ )



**Рис. 3.** Фосфатазная активность общая (*a*) и STEP-специфичная (*б*) в головном мозге *D. rerio* после 72 ч в воде (контроль) и растворах 2 мг/л *n*-хлорфенилаланина или 0.5 мг/л паргилина. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 по сравнению с контролем.

в мозге рыб. Содержание рыб в течение 72 ч в воде как с 2 мг/л *n*-хлорфенилаланина, так и с 0.5 мг/л паргилина, приводило к снижению общей активности фосфатаз на 17% (*n*-хлорфенилаланин, p < 0.01) и на 26% (паргилин, p < 0.001)) (рис. 3*a*), а также активности STEP – на 15% (*n*-хлорфенилаланин, p < 0.01) и на 13.5% (паргилин, p < 0.05)) (рис. 3*b*) в мозге рыб по сравнению с контролем. Показаны высокие коэффициенты корреляции между общей активностью всех фосфатаз и активностью STEP (r = 0.86, n = 27, p < 0.01). В то же время, активность STEP не коррелировала с уровнем мРНК гена *ptpn5* в головном мозге рыб (r = 0.02, n = 27, p > 0.05).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами изучено влияние *n*-хлорфенилаланина и паргилина на активность белка STEP и экспрессию гена *ptpn5* в головном мозге *D. rerio*. Эти препараты применяют для снижения и повышения уровня 5-НТ в мозге. В предварительных экспериментах мы подобрали оптимальные дозы препаратов и показали, что у рыб, которые в течение 72 ч находились в воде, содержащей 2 мг/л *n*-хлорфенилаланина или 0.5 мг/л паргилина, уровень 5-НТ снизился в 4 раза или повысился в 6 раз, соответственно, по сравнению с нормой.

Впервые показано, что длительное введение как *n*-хлорфенилаланина, так и паргилина снизило общую фосфатазную активность и активность STEP в целом мозге *D. rerio*. Учитывая значительные изменения в уровне 5-HT, вызванные введением этих препаратов, можно предполагать, что снижение активности STEP ассоциировано именно со снижением и увеличением уровня 5-НТ. Важно отметить, что при этом не выявлено изменений в уровне мРНК гена *ptpn5*. Следовательно, можно предположить, что длительное воздействие *n*-хлорфенилаланина и паргилина влияет на посттрансляционные механизмы регуляции активности STEP в мозге рыб.

Описано несколько пострансляционных механизмов, способных снижать активность белка STEP: это фосфорилирование, убиквитинирование, димеризация молекул фермента [3]. Наиболее хорошо изучено обратимое фосфорилирование – эффективный и быстрый механизм посттрансляционной регуляции активности фермента. Показано, что фосфорилирование сАМР-зависимой протеинкиназой А снижает активность STEP [23]. Известно, что 5-НТ способен увеличивать уровень сАМР через свои Gs-связанные рецепторы -5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> и 5-HT<sub>7</sub>, и снижать его через Gi-связанные рецепторы – 5-HT<sub>1A</sub>-5-HT<sub>1F</sub> [24, Обнаружена высокая гомология системы 5-НТ мышей и рыб D. rerio [26, 27]. Все это позволяет предположить, что ингибирование STEP, наблюдаемое при избытке 5-НТ в мозге, вызвано, скорее всего, активацией рецепторов 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> и 5-НТ<sub>7</sub> (рис. 4). Тогда как ингибирование STEP при недостатке 5-НТ обусловлено, возможно, дисбалансом различных типов рецепторов 5-НТ в мозге или действием компенсаторных механизмов, вызванных резким снижением медиатора. Однако тот факт, что и избыток, и недостаток 5-НТ существенно влияют на активность STEP, свидетельствует о ключевой роли 5-НТ-системы в пост-



**Рис. 4.** Схема регуляции белка STEP через рецепторы 5-HT. 5-HT через рецепторы 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub> активирует, а через рецепторы 5-HT<sub>1A</sub> ингибирует сАМРзависимую протеинкиназу А (РКА), которая фосфорилирует и инактивирует STEP прямо или посредством фосфорилирования белка DARPP-32 и блокады протеинфосфатазы 1 (РР1). С другой стороны, 5-HT через рецепторы 5-HT<sub>2A</sub> и 5-HT<sub>2C</sub> активирует протеинфосфатазу 2В (РР2В, кальцинейрин), которая дефосфорилирует и активирует STEP через дефосфорилирование белка DARPP-32P и активацию протеинфосфатазы 1 (РР1).

трансляционной регуляции активности STEP в мозге *D. rerio*.

Недавно мы показали, что трехкратное введение *п*-хлорфенилаланина и паргилина снижает экспрессию гена *ptpn5* в стриатуме мышей, но не влияет на экспрессию этого гена в коре и гиппокампе, а также на активность STEP в стриатуме, гиппокампе и коре [20]. В настоящей работе с использованием в качестве модели D. rerio нами впервые выявлено участие 5-НТ в регуляции активности STEP. Однако следует подчеркнуть, что в экспериментах на рыбах, где *n*-хлорфенилаланин и паргилин добавляют непосредственно в воду, изменения уровня 5-НТ в мозге были более выраженными, чем при внутрибрюшинном введении этих препаратов мышам. Можно предположить, что значительное снижение и увеличение уровней 5-НТ позволило увидеть изменения в активности STEP в мозге рыб, тогда как отсутствие изменений в экспрессии гена ptpn5 у D. rerio может быть связано с использованием целого мозга, а не его отдельных структур.

В последние годы для изучения процессов, происходящих в организме, а также механизмов действия фармакологических препаратов все более активно используют лабораторных рыб. Серотониновая система участвует в регуляции депрессивно-подобного и тревожного поведения. Ингибитор МАО паргилин является классическим антидепрессантом, который снижает проявление депрессивно-подобного поведения у грызунов [28]. Ингибиторы МАО оказывают анксиолитический эффект на *D. rerio* [29], тогда как влияние *n*-хлорфенилаланина на тревожно-подобное поведение *D. rerio* зависит от используемого теста [30]. Поскольку мы обнаружили изменения в активности белка STEP как при увеличении, так и при снижении уровня 5-НТ в мозге, можно предположить, что у рыб 5-НТ влияет на активность белка STEP и участвует в регуляции поведения.

Таким образом, результаты нашей работы указывают на существование взаимосвязи между серотониновой системой и белком STEP в мозге рыб, что подтверждает данные, полученные ранее на грызунах [8–10, 20].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые установлено, что *n*-хлорфенилаланин и паргилин снижают активность STEP в головном мозге *D. rerio*. В то же время ни *n*-хлорфенилаланин. ни паргилин не влияли на экспрессию гена *ptpn5*, кодирующего белок STEP, в исследованной модели. Показано, что *D. rerio* можно использовать в качестве модели для изучения связи белка STEP с серотониновой системой.

Авторы благодарны сотрудникам лаборатории физиологически активных веществ Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН за любезно предоставленное вещество TC-2153.

Исследование поддержано Бюджетным проектом 0259-2021-0015.

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kalueff A.V., Stewart A.M., Gerlai R. (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 63–75.
- Stewart A.M., Braubach O., Spitsbergen J., Gerlai R., Kalueff A.V. (2014) Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci.* 37, 264–278.
- Goebel-Goody S.M., Baum M., Paspalas C.D., Fernandez S.M., Carty N.C., Kurup P., Lombroso P.J. (2012) Therapeutic implications for striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) in neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Rev.* 64, 65–87.
- 4. Nguyen T.H., Liu J., Lombroso P.J. (2002) Striatal enriched phosphatase 61 dephosphorylates Fyn at phosphotyrosine 420. *J. Biol. Chem.* **277**, 24274–24279.
- 5. Xu J., Kurup P., Bartos J.A., Patriarchi T., Hell J.W., Lombroso P.J. (2012) Striatal-enriched protein-tyro-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

sine phosphatase (STEP) regulates Pyk2 kinase activity. J. Biol. Chem. 287, 20942–20956.

- Kurup P., Zhang Y., Xu J., Venkitaramani D.V., Haroutunian V., Greengard P., Nairn A.C., Lombroso P.J. (2010) A beta-mediated NMDA receptor endocytosis in Alzheimer's disease involves ubiquitination of the tyrosine phosphatase STEP61. *J. Neurosci.* **30**, 5948– 5957.
- Синякова Н.А., Куликова Е.А., Енглевский Н.А., Куликов А.В. (2017) Эффекты флуоксетина и потенциального антидепрессанта гидрохлорида 8-трифторметил-1,2,3,4,5-бензопентатиепин-6-амина (TC-2153) на поведение в тесте "новый резервуар", биогенные амины и их метаболиты в мозге рыбок *Danio rerio. Бюлл. Эксп. Биол. Med.* 164, 573–576.
- Kulikova E.A., Bazhenova E.Y., Popova N.K., Khomenko T.M., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Kulikov A.V. (2015) Effect of acute administration of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153) on biogenic amines metabolism in mouse brain. *Lett. Drug Design Discov.* 12, 833–836.
- Куликов А.В., Тихонова М.А., Куликова Е.А., Хоменко Т.М., Корчагина Д.В., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф., Попова Н.К. (2011) Влияние нового потенциального психотропного препарата гидрохлорида 8-(трифторметил)-1,2,3,4,5-бензопентариепин-6-амина на экспрессию генов, вовлеченных в метаболизм и рецепцию медиатора серотонина, в головном мозге мышей. *Молекуляр. биология.* 45, 282–288.
- Kulikova E.A., Khotskin N.V., Illarionova N.B., Sorokin I.E., Bazhenova E.Y., Kondaurova E.M., Volcho K.P., Khomenko T.M., Salakhutdinov N.F., Ponimaskin E., Naumenko V.S., Kulikov A.V. (2018) Inhibitor of striatal-enriched protein tyrosine phosphatase, 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin-6-amine hydrochloride (TC-2153), produces antidepressant-like effect and decreases functional activity and protein level of 5-HT(2A) receptor in the brain. *Neuroscience.* 394, 220–231.
- Kulikov A.V., Gainetdinov R.R., Ponimaskin E., Kalueff A.V., Naumenko V.S., Popova N.K. (2018) Interplay between the key proteins of serotonin system in SSRI antidepressants efficacy. *Expert Opin. Ther. Targets.* 22, 319–330.
- Popova N.K., Naumenko V.S. (2019) Neuronal and behavioral plasticity: the role of serotonin and BDNF systems tandem. *Expert Opin. Ther. Targets.* 22, 227–239.
- Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hörtnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* 299, 76.
- 14. Popova N.K., Kulikov A.V. (2010) Targeting tryptophan hydroxylase 2 in affective disorder. *Expert Opin*. *Ther. Targets.* **14**, 1259–1271.
- Kulikov A.V., Popova N.K. (2015) Tryptophan hydroxylase 2 in seasonal affective disorder: underestimated perspectives? *Rev. Neurosci.* 26, 679–690.
- Kulikova E.A., Kulikov A.V. (2019) Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models. *Expert Opin. Ther. Targets.* 23, 655–667.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

- Shih J.C., Thompson R.F. (1999) Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 593–598.
- Allen D.L., Renner K.J., Luine V.N. (1993) Pargylineinduced increase in serotonin levels: correlation with inhibition of lordosis in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 837–841.
- Edmondson D.E., Mattevi A., Binda C., Li M., Hubálek F. (2004) Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Curr. Med. Chem.* 11, 1983–1993.
- Куликова Е.А., Фурсенко Д.В., Баженова Е.Ю., Куликов А.В. (2020) Паргилин и *п*-хлорфенилаланин снижают экспрессию гена *Ptpn5*, кодирующего стриатумспецифичную протеинтирозинфосфатазу (STEP), в стриатуме мышей. *Молекуляр. биология.* 54, 313–320.
- Khotskin N.V., Plyusnina A.V., Kulikova E.A., Bazhenova E.Y., Fursenko D.V., Sorokin I.E., Kolotygin I., Mormede P., Terenina E.E., Shevelev O.B., Kulikov A.V. (2019) On association of the lethal yellow (AY) mutation in the agouti gene with the alterations in mouse brain and behavior. *Behav. Brain Res.* 359, 446–456.
- Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. (2005) Quantitative RT-PCR assay of 5-HT1A and 5-HT2A serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. *J. Neurosci. Methods.* 141, 97–101.
- 23. Paul S., Snyder G.L., Yokakura H., Picciotto M.R., Nairn A.C., Lombroso P.J. (2000) The Dopamine/D1 receptor mediates the phosphorylation and inactivation of the protein tyrosine phosphatase STEP via a PKAdependent pathway. *J. Neurosci.* **20**, 5630–5638.
- Barnes N.M., Sharp T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*. 38, 1083–1152.
- Pytliak M., Vargova V., Mechirova V., Felsoci M. (2011) Serotonin receptors – from molecular biology to clinical applications. *Physiol. Res.* 60, 15–25.
- Panula P., Chen Y.C., Priyadarshini M., Kudo H., Semenova S., Sundvik M., Sallinen V. (2010) The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol. Dis.* 40, 46–57.
- 27. Gaspar P., Lillesaar C. (2012) Probing the diversity of serotonin neurons. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **67**, 2382–2394.
- 28. Borsini F. (1995) Role of the serotonergic system in the forced swimming test. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **19**, 377–395.
- Stewart A.M., Cachat J., Gaikwad S., Robinson K.S., Gebhardt M., Kalueff A.V. (2013) Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in zebrafish. *Neurochem. Int.* 62, 893–902.
- Maximino C., Puty B., Benzecry R., Araújo J., Lima M.G., de Jesus Oliveira Batista E., Renata de Matos Oliveira K., Crespo-Lopez M.E., Herculano A.M. (2013) Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and *para*chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. *Neuropharmacology*. **71**, 83–97.

# DECREASE OF STRIATAL-ENRICHED PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE (STEP) ACTIVITY IN THE BRAIN OF ZEBRAFISH *Danio rerio* TREATED WITH *p*-CHLOROPHENYLALANINE AND PARGYLINE

E. A. Kulikova<sup>1, \*</sup>, D. V. Fursenko<sup>1</sup>, E. Yu. Bazhenova<sup>1</sup>, and A. V. Kulikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal research center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

\*e-mail: lisa\_kulikova@ngs.ru, kulikova@bionet.nsc.ru

Zebrafish *Danio rerio* is a widespread model for the study of basic neurobiological mechanisms. A selective inhibitor of striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) reduces serotonin metabolism in the brain of *D. rerio*. Both STEP and serotonin are involved in various neurodegenerative pathologies of behavior. The reduction or elevation of serotonin levels in the brain of mice caused by the administration of *p*-chlorophe-nylalanine or pargyline, respectively, significantly decrease the mRNA level of the *Ptpn5* gene encoding STEP in the striatum. However, the question of how fundamental this interaction is and whether it takes place in other organisms remained unknown. Here, we investigated the effect of inhibitors of synthesis (*p*-chlorophe-nylalanine) and destruction (pargyline) of serotonin on the expression of the *ptpn5* gene and STEP activity in the brain of zebrafish *D. rerio*. Animals were exposed for 72 hours to water (control) or to solution of 2 mg/L of *p*-chlorophenylalanine or 0.5 mg/L of pargyline. Exposure to *p*-chlorophenylalanine reduced the levels of serotonin in the fish brain fourfold, whereas pargyline increased the level of this neurotransmitter sixfold. Therefore, both *p*-chlorophenylalanine and pargyline reduce STEP activity in the brain of *D. rerio*. Thereby, the interaction between STEP and the serotonin system is observed in both mammals and zebrafish.

Keywords: zebrafish, *Danio rerio*, striatal-enriched protein tyrosine phosphatase, STEP, *ptpn5*, gene expression, serotonin, brain, *p*-chlorophenylalanine, pargyline

### — МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ —

УДК 616.5-006.81.04:576.08

## *FOXC1*-ОПОСРЕДОВАННОЕ ВЛИЯНИЕ микроРНК miR-204-5р НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

© 2021 г. И. Ю. Дубовцева<sup>*a*</sup>, М. Б. Аксененко<sup>*a*</sup>, Е. Д. Николаева<sup>*a*</sup>, А. С. Аверчук<sup>*a*</sup>, А. В. Мошев<sup>*c*</sup>, А. А. Савченко<sup>*c*</sup>, С. В. Маркова<sup>*b*</sup>, Т. Г. Рукша<sup>*a*</sup>, \*

<sup>а</sup>Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения России, Красноярск, 660022 Россия

<sup>b</sup>Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, обособленное подразделение Федерального исследовательского центра "Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук", Красноярск, 660022 Россия

<sup>с</sup>Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, 660022 Россия

\*e-mail: tatyana\_ruksha@mail.ru Поступила в редакцию 17.08.2020 г. После доработки 24.10.2020 г.

Принята к публикации 11.11.2020 г.

МикроРНК эпигенетически регулируют физиологические и патологические процессы. Ранее нами выявлено, что микроРНК miR-204-5р низко экспрессирована в клетках меланомы, а повышение ее уровня приводит к изменению пролиферации, миграции и инвазии этих раковых клеток. Теперь с помощью биоинформатического анализа показано, что мишень miR-204-5p – мPHK, кодирующая транскрипционный фактор FOXC1, играющий важную роль в канцерогенезе. С помощью люциферазной репортерной системы обнаружено, что miR-204-5р подавляет экспрессию гена FOXC1 посредством связывания с его 3'-некодирующей областью. Трансфекция малой интерферирующей РНК (siPHK), нацеленной на FOXC1, в клетки меланомы вызывала снижение уровня miR-204-5p, что согласуется с общепринятыми представлениями о регуляции экспрессии микроРНК генамимишенями по принципу обратной связи. По результатам МТТ-теста и флуоресцентной микроскопии, уровень пролиферации клеток меланомы под действием siPHK к FOXC1 снижался через 72 ч после трансфекции. Методом проточной цитометрии проанализированы изменения в соотношении клеток по фазам клеточного цикла. Выявлены регуляторные взаимосвязи между FOXC1 и miR-204-5p, а также ингибирующий эффект нокдауна FOXC1 на пролиферацию клеток меланомы. На основании полученных результатов можно предположить, что miR-204-5p регулирует пролиферацию клеток меланомы через воздействие на экспрессию FOXC1.

**Ключевые слова:** FOXC1, miR-204-5p, меланома, BRO, SK-MEL-2, siPHK, микроPHK, опухолевые дормантные клетки

DOI: 10.31857/S0026898421030058

Резистентность опухолей к терапевтическим средствам относится к одной из важнейших проблем современной онкологии. Это обусловлено многими факторами, в том числе гетерогенностью опухолевой ткани и возможным наличием в ней пула дормантных (спящих, G<sub>0</sub>) клеток в пределах одной опухоли. Неизвестно, на каком этапе канцерогенеза формируются дормантные клетки [1], однако они способны сохраняться в организме после проведения противооопухолевой терапии, циркулировать с кровотоком и оседать в других органах и тканях, принимая участие в развитии метастазирования [2]. Молекулярные механизмы активации (трансформации в пролиферирующие опухолевые клетки) дормантных клеток, перехода из  $G_0$  в  $G_1$ , не поняты до конца. Предполагается,

что в этом процессе принимают участие компоненты системы иммунного надзора, опухолевого микроокружения, а также эпигенетические регуляторы, в том числе микроРНК.

МикроРНК представляют собой короткие (20–24 н.) некодирующие РНК, которые вовлечены в посттранскрипционную регуляцию генной экспрессии. МикроРНК, транскрибируемые с геномной ДНК и подвергающиеся дальнейшему процессингу и экспорту в цитоплазму [3, 4], играют важную роль в регуляции многих физиологических и патологических процессов [5]. Ранее нами показано, что микроРНК miR-204-5p – одна из низкоэкспрессируемых микроРНК в клетках меланомы, но не в меланоцитарных невусах [6]. Выявлено, что восстановление уровня miR-204-5p в опухолевых клетках приводит к изменению скорости их пролиферации, миграции и инвазии [7]. Кроме того, недавно Díaz-Martínez и соавт. [8] обнаружили, что восстановление экспрессии miR-204-5р в клетках меланомы вызывает потерю резистентности к противоопухолевому таргетному препарату вемурафенибу. Авторы предложили разные возможные механизмы этого явления, в том числе воздействие miR-204-5р на регуляторы клеточного цикла и апоптоза. Мы предположили, что miR-204-5р не только напрямую участвует в регуляции хода клеточного цикла, но влияет и на переход клеток в покоящееся состояние, G<sub>0</sub>. Дело в том, что одна из причин резистентности клеток к противоопухолевым средствам связана именно с опухолевыми клетками, находящимися в фазе G<sub>0</sub> и поэтому не чувствительными к действию агентов, подавляющих пролиферацию.

Нами исследованы механизмы регуляции пролиферации клеток меланомы под действием микроPHK miR-204-5р.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток меланомы. Эксперименты проводили на клетках меланомы человека BRO (предоставлена ФГБНУ "НИИ фундаментальной и клинической иммунологии", Новосибирск, Россия) и SK-MEL-2 ("Биолот", Россия). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с L-глутамином ("ПанЭко", Россия) с 10%-ной фетальной сывороткой крупного рогатого скота (FBS; "Gibco, Thermo Fisher Scientific", США) при 37°С и 5% CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Sanyo MSO-5AC ("Sanyo Electric Co., Ltd.", Япония).

Биоинформатический анализ. Поиск и анализ генов-мишеней miR-204-5p проведен с использованием четырех баз данных и программ TargetScan (версия 7.0; http://www.targetscan.org), miRDB (версия 5.0; http://mirdb.org/miRDB), miRWalk (http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/ 2.0mirwalk2/) и miRTarBase (версия 4.5; http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/). Рассматривали гены-мишени miR-204-5p, которые встречались во всех четырех базах данных. На следующем этапе были выделены гены-мишени, значения TargetScore (вероятность, выведенная из распределения генов-мишеней микроРНК при помощи логарифмической модели Байеса–Гаусса) которых в базе miRDB были не ниже 80. Это связанно с тем, что все гены-мишени распределены особым алгоритмом по баллам прогноза от 50 до 100. Для оценки роли miR-204-5р в регуляции внутренней сигнализации с помощью программы PANTHER v10.0 (www.pantherdb.org) проведен анализ изменяемых в клетках метаболических и сигнальных каскадов.

Проектирование siPHK для нокдауна FOXC1. Подбор последовательностей siPHK и скремблированных РНК для отрицательного контроля проводили с использованием программы siDirect 2 (http://sidirect2.rnai.jp); siPHK подбирали с помощью программы Wizard Software v.3.1. ("Invitrogen, Thermo Fisher Scientific", США).

Критериями для отбора были следующие параметры: содержание G/C нуклеотидов 35–55%, последовательность размером 20–25 н., отсутствие транскриптов других генов, совпадающих с последовательностями выбранных siPHK, по результатам анализа с помощью системы BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Отобранные последовательности не содержали более трех одинаковых нуклеотидов подряд и нуклеотидных повторов. Для оценки специфичности нокдауна в клетках в качестве отрицательного контроля использовали скремблированные siPHK.

Синтез смысловых скремблированных siPHK проведен компанией ООО "Синтол" (Россия): FOXC1\_sense siPHK: 5'-GGGAAUAGUAGCU-GUCAAATTdTdT-3';

FOXC1\_scramble siPHK: 5'-GGAATGGTAGCGA-CATATATT-3'.

Трансфекцию siPHK в клетки меланомы BRO и SK-MEL-2 выполняли при достижении клетками плотности 70%.

Оценка жизнеспособности клеток меланомы. Для оценки пролиферации клеток меланомы BRO и SK-MEL-2 использовали МТТ-тест. Клетки культивировали в 96-луночном планшете без вмешательств 24 ч и по достижении концентрации 1 × 10<sup>4</sup> клеток в 100 мкл питательной среды их трансфицировали siPHK к FOXC1. Трансфекцию проводили при помощи Lipofectamine 3000 ("Thermo Fisher Scientific") согласно инструкции производителя. Через 24 ч питательную среду удаляли, в каждую лунку добавляли раствор 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромида (MTT) ("Invitrogen, ThermoFisher Scientific") в концентрации 5 мг/мл, в количестве 15 мкл МТТ на 135 мкл питательной среды. Клетки с раствором МТТ инкубировали 4 ч при 37°С и 5% СО<sub>2</sub> в СО<sub>2</sub>-инкубаторе. По интенсивности накопления формазана оценивали метаболическую активность клеток, соответствующую интенсивности пролиферации, через сутки, двое и трое суток после трансфекции. Измерения проводили на спектрофотометре Efos-9305 ("Shvabe Photosystems", Россия) при длине волны 560 нм. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансфицированные скремблированной siPHK. Эксперимент проводили в трех технологических повторах. Данные нормировали на соответствующие значения в контроле и выражали в процентах.

Флуоресцентная микроскопия. Для проведения флуоресцентной микроскопии клетки BRO

и SK-MEL-2, трансфицированные siPHK в концентрации 5  $\times$  10<sup>4</sup> клеток/мл, рассевали в 96-луночный планшет и инкубировали 24 ч при 37°С и 5% СО<sub>2</sub>. Через 24, 48 и 72 ч клетки окрашивали с использованием набора реагентов CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay ("Thermo Fisher Scientific"), в состав которого входит зеленый флуоресцентный краситель, напрямую связывающийся с ДНК. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре проводили флуоресцентную микроскопию с использованием системы визуализаиии клеток Floid<sup>®</sup> Cell Imaging Station (Floid Software, версия 22809; "Thermo Fisher Scientific") при увеличении ×460. Подсчет клеток проводили в 10 полях зрения. Ядра пролиферирующих клеток окрашивались в зеленый цвет, ядра живых непролифирирующих клеток оставались неокрашенными. Эксперимент проводили в трех технологических повторах.

Люциферазная репортерная система для оценки воздействия микроРНК. Для подтверждения FOXC1 как функционально значимого гена-мишени miR-204-5р в клетках меланомы использовали люциферазную репортерную систему Ambion® pMIR-REPORT Luciferase miRNA Expression Reporter Vector System ("Invitrogen<sup>™</sup>, Applied Biosystems", США). Прежде всего была синтезирована нуклеотидная последовательность 3'-некодирующей области (3'-UTR) гена FOXC1, содержащая предсказанный сайт-мишень для miR-204-5p. Затем синтезированный фрагмент ДНК клонировали в 3'-UTR гена люциферазы светлячка (*Rluc*) в репортерной плазмиде pMIR-REPORT согласно инструкции производителя. Корректность полученной конструкции подтверждена секвенированием. В полученной плазмиде экспрессия люциферазного репортера подвергается регуляции, которая имитирует регуляцию FOXC1 через анализируемую область с сайтом-мишенью микроРНК. Вторую нормировочную плазмиду системы pMIR-REPORT- $\beta$ -gal, содержащую ген β-галактозидазы (GALB), использовали как внутренний стандарт для нормирования сигнала с целью устранения возможных различий в трансфекционной эффективности отдельных образцов. Плазмиду pMIR-REPORT-β-gal добавляли при трансфекции в соотношении 1 : 10. Трансфекцию полученной конструкции осуществляли в клетки меланомы линии BRO и SK-MEL-2 при помощи Lipofectamine 3000 ("Thermo Fisher Scientific"). Отрицательными контролями служили нетрансфицированные клетки меланомы BRO и SK-MEL-2, не содержащая последовательность 3'-UTR гена FOXC1 плазмидная ДНК, трансфицированные только синтетическим аналогом (миметиком) miR-204-5p, mirVana®miRNA ("Ambion", "Thermo Fisher Scientific"), клетки с конечным содержанием миметика 30 нМ.

Эффективность трансфекции оценивали прямым подсчетом флуоресцирующих клеток под микроскопом после трансфекции контрольной плазмидой pcDNA3m3-cgreGFP2 (несущей ген *gfp Clytia gregaria*, мутированный для созревания при 37°C) в концентрации, равной таковой для исследуемой плазмиды (GFP-вектор предоставлен лабораторией фотобиологии Института биофизики СО РАН, обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия).

Люциферазную активность клеток меланомы анализировали через 24 ч после трансфекции с использованием набора Dual-Light<sup>®</sup> Systems ("Applied Biosystems"). Клетки лизировали и, согласно инструкции производителя, добавляли в лизат буфер А, субстрат β-галактозидазы Galacton-Plus<sup>®</sup> в разведении 1:100 в буфере В, в состав которого входил субстрат люциферазы люциферин. Ферментативную активность люциферазы и В-галактозидазы измеряли на планшетном люминометре Mithras LB 940 Multimode Reader ("Berthold Technologies GmbH&Co", Германия) при длине волны 560 нм для люциферазы и 420 нм для В-галактозидазы. Относительную люциферазную активность, отражающую уровень экспрессии FOXC1, рассчитывали по соотношению интенсивности люминесценции продукта люциферазной реакции к таковой для продукта реакции β-галактозидазы в каждой лунке.

Оценка эффекта вемурафениба на пролиферацию клеток меланомы. Концентрацию 50%-ного ингибирования (IC<sub>50</sub>) пролиферации клеток меланомы определяли при помощи МТТ-теста. Клетки меланомы BRO и SK-MEL-2 культивировали в 96-луночном планшете 24 ч до достижения концентрации  $2 \times 10^5$  клеток в 500 мкл питательной среды RPMI-1640 с L-глутамином и 10% FBS, после чего в лунки вносили вемурафениб ("Carbosynth Ltd", Англия), растворенный в DMSO ("Panreac quimica SA", Испания), в конечной концентрации 0.75, 1.25, 2.5, 5.0 и 10.0 мкМ. В качестве контроля использованы клетки с DMSO в концентрации, соответствующей таковой в 5.0 мкМ вемурафенибе. Клетки культивировали в течение 72 ч, после чего питательную среду удаляли и вносили в каждую лунку 135 мкл свежей питательной среды и 15 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл. Планшет помещали в СО<sub>2</sub>-инкубатор на 4 ч при 37°С и 5% СО<sub>2</sub>. Метаболическую активность клеток оценивали спектрофотометрически и рассчитывали по формуле:  $(OD_s/OD_m) \times 100\%,$ где значения OD<sub>s</sub> и OD<sub>m</sub> соответствуют оптической плотности клеток экспериментального и контрольного образца при длине волны 560 нм. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре Anthos 2010 ELISA ("Biochrom Ltd", Англия). Значение IC<sub>50</sub> рассчитывали с использованием программного обеспечения Graphpad PRISM 8.0. Эксперимент проводили в трех технологических повторах.

Дормантные клетки выделяли по методу, описанному ранее [9], с применением противоопухолевого агента вемурафениба в концентрации 10 IC<sub>50</sub>. Клетки культивировали 3 суток, заменяли питательную среду на свежую и культивировали еще 48 ч, после чего, используя Lipofectamine 3000, проводили трансфекцию siPHK для подавления экспрессии *FOXC1*.

Определение доли клеток, находящихся в фазе G<sub>0</sub>, методом проточной цитометрии. После инкубации с вемурафенибом клетки меланомы BRO и SK-MEL-2 в концентрации  $3 \times 10^5$  клеток/лунка снимали с 6-луночного планшета буфером трипсин-EDTA ("ПанЭко"), центрифугировали при 10000  $\times$  g на центрифуге miniSpin ("Ependorf", Германия) в течение 5 мин и удаляли надосадочную жидкость. Клеточную суспензию фиксировали метиловым спиртом (70-100%). Для этого 0.5 мл метилового спирта добавляли к полученному осадку и инкубировали в течение 30 мин. Для пермеабилизации фиксированных клеток использовали обработку тритоном Х-100 в течение 15 мин. После каждого этапа клетки промывали дважды фосфатно-солевым буфером (PBS). Клетки окрашивали анти-Кі-67-моноклональными антителами, конъюгированными с FITC (#11-5698-82, "eBioscience<sup>TM</sup>", "Thermo Fisher Scientific") в разведении 1 : 200 в FBS. По завершении процедуры окрашивания в образцы вносился ДНК-связывающий краситель – йодистый пропидий (PI) ("Thermo Fisher Scientific, Inc.", Нидерланды) до концентрации 100 мкг/мл и инкубировали в течение 15 мин.

Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Navios ("Beckman Coulter, Inc.", США) Центра коллективного пользования КНЦ СО РАН с использованием синего лазера (488 нм) и детекторных фильтров. Полоса пропускания для FITC составляла 530/30 нм, а для PI – 610/20 нм.

Результаты анализировали с использованием программы Navios Software v. 1.2 и Kaluza v. 2.1.1 ("Весктап Coulter, Inc."); при этом в каждом образце исследовали не менее 50000 клеток. Гейтирование клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, выполняли в логарифмическом режиме. Для клеток, находящихся в фазе  $G_0$ , характерна Ki-67-негативность и низкие уровни PI-сигнала. В этой связи гейтирование клеток в  $G_0$ -фазе оценивали в диапазоне до 10 по шкале флуоресценции Ki-67-FITC (отрицательный результат) и в диапазоне 0.7–1.3 относительных единиц флуоресценции по PI.

Определение уровня экспрессии miR-204-5р в клетках меланомы. Реакцию обратной транскрипции проводили с применением набора реагентов MMLV RT kit ("Евроген", Россия). Для синтеза кДНК использовали набор случайных праймеров из MMLV RT kit ("Евроген") и специфичные праймеры для микроРНК TaqMan Assays hsamiR-204-5p (No A25576, "Applied Biosystems<sup>TM</sup>", "Thermo Fisher Scientific").

Уровень экспрессии miR-204-5р определяли методом ПЦР в реальном времени, используя амплификатор StepOne<sup>TM</sup> Real-Time PCR System ("Applied Biosystems", "Thermo Fisher Scientific"), с 40 циклами амплификации. В качестве эндогенных контролей использовали малые ядерные PHK (snPHK) RNU6A и RNU6B ("Applied Biosystems"). Эксперимент проводили в трех повторах. Для анализа данных использовали метод  $\Delta\Delta$ CT.

Статистическая обработка. Статистическую значимость полученных различий рассчитывали с использованием критерия Стьюдента и *U*-теста Манна—Уитни в программном пакете для статистического анализа Statistica 12.0 ("StatSoft", Россия). Результаты считались значимыми при p < 0.05. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (SD).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация FOXC1 как возможной мишени miR-204-5p

В результате проведенного биоинформатического анализа для miR-204-5р выявлено 235 генов-мишеней. По четырем примененным базам данных выявлено 36 общих генов, из которых 13 участвует в регуляции пролиферации клеток. Последующий анализ генных онтологий биологических процессов и молекулярных функций при помощи системы PANTHER v10.0 позволил из 13 вышеуказанных генов идентифицировать те, биологические функции которых связаны с процессом клеточной пролиферации: *SIRT1* (sirtuin 1), *FOXC1* (forkheadbox C1), *TGFBR1* (transforming growth factor beta receptor 1) и *USP47* (ubiquitin specific peptidase 47).

Анализ последовательности *FOXC1* человека (NM\_001453) показал, что 3'-UTR его мPHK содержит участки с высокой степенью комплементарности нуклеотидов к последовательности miR-204-5p. На основании этих данных можно было предположить, что идентифицированная последовательность в составе мPHK FOXC1 представляет собой сайт связывания miR-204-5p, причем с сильным регуляторным эффектом (рис. 1).

### Исследование FOXC1 как прямой мишени miR-204-5p

Для подтверждения *FOXC1* как функционально значимого гена-мишени miR-204-5р мы оценили регуляторную активность этой микроPHK,

### FOXC1-ОПОСРЕДОВАННОЕ ВЛИЯНИЕ микроРНК miR-204-5p

5'-UGCAACAUAGU... AAAAAGGGAAA-3'

мРНК FOXC1 2689

miR-204-5p

#### 

Рис. 1. Предсказанное связывание miR-204-5p с 3'-UTR мPHK FOXC1 (Homo sapiens forkhead box C1; Gene ID 2296).



**Рис. 2.** Относительная люциферазная активность в клетках меланомы SK-MEL-2 и BRO через 48 ч после трансфекции миметика miR-204-5p. \*p = 0.005.



**Рис. 3.** Экспрессия miR-204-5p в клетках меланомы SK-MEL-2 (*a*) и BRO ( $\delta$ ), трансфицированных siPHK к *FOXC1*. Уровень экспрессии miR-204-5p рассчитывали относительно экспрессии RNU6A и RNU6B до и после воздействия siPHK *FOXC1*. Здесь и на других рисунках: siPHK<sub>sc</sub> – скремблированная siPHK; \**p* < 0.05.

используя люциферазную репортерную конструкцию, содержащую 3'-UTR гена *FOXC1* с сайтоммишенью для miR-204-5р. Обнаружено, что miR-204-5р ингибировала люциферазную активность репортерной системы на 72% в клетках меланомы линии BRO и на 34% в клетках меланомы линии SK-MEL-2 (рис. 2). Из этого можно сделать вывод, что miR-204-5р действительно подавляет экспрессию *FOXC1*.

Кроме того, нами исследовано влияние siPHK к *FOXC1*, трансфицированной в клетки меланомы, на экспрессию miR-204-5p. Обнаружено, что в этом случае уровень miR-204-5p снижался в клетках BRO до 0, а в клетках SK-MEL-2 с 1.23 до 0.64 (рис. 3).

### Снижение уровня FOXC1 в клетках меланомы сопровождается снижением пролиферативной активности

Нами исследовано влияние трансфекции siPHK *FOXC1* в клетки меланомы на уровень их пролиферации. По данным МТТ-теста, через 72 ч после трансфекции жизнеспособность клеток BRO и

2820



**Рис. 4.** Жизнеспособность клеток меланомы BRO (*a*) и SK-MEL-2 (*b*) через 24, 48 и 72 ч после трансфекции siPHK *FOXC1*. Жизнеспособность клеток определяли в MTT-тесте; за 100% принята пролиферативная активность контрольных клеток.

SK-MEL-2 снижалась на 39 и 40% соответственно по сравнению с контрольными клетками, трансфицированными скремблированной siPHK (рис. 4).

Аналогичные данные получены и методом иммунофлуоресцентной микроскопии: через 72 ч после трансфекции пролиферация клеток BRO и SK-MEL-2 снижалась соответственно в 2.7 и 1.5 раза (рис. 5). Таким образом, логично предположить, что ген *FOXC1* — мишень miR-204-5p, а индуцируемое этим взаимодействием снижение уровня тран-



**Рис. 5.** Пролиферативная активность клеток меланомы BRO и SK-MEL-2 через 72 ч после трансфекции siPHK *FOXC1* по результатам флуоресцентной микроскопии на основе визуализации живых, пролиферирующих, неповрежденных клеток с помощью ДНК-связывающего красителя по технологии CyQUANT Direct Cell Proliferation Assay.

скрипционного фактора FOXC1 приводит к изменению скорости пролиферации клеток меланомы.

### Влияние вемурафениба и siPHK к FOXC1 на экспрессию miR-204-5p

Нами проанализировано влияние на пролиферацию клеток меланомы противоопухолевого средства вемурафениб. Это соединение относится к группе таргетных препаратов, нацеленных на мутантный белок BRAF - компонент сигнального каскада МАРК [10]. Известно, что опухолевые клетки в пределах одной опухоли могут быть гетерогенны по мутационному статусу. Индуцируя апоптоз в BRAF-позитивных клетках, BRAF-негативные клетки могут сохранять жизнеспособность, в том числе находясь или переходя в состояние покоя – фазу G<sub>0</sub>. Показано, что применение цитостатических средств может способствовать переходу опухолевых клеток в фазу G<sub>0</sub> [11]. Учитывая эти данные, мы проанализировали действие BRAF-ингибитора вемурафениба (в концентрации 10 IC<sub>50</sub>) на клетки SK-MEL-2. Методом проточной цитометрии установлено, что при обработке вемурафенибом доля Кі-67-негативных клеток увеличивается с 7 до 35%, в то время как уровень miR-204-5p снижается на 65%. Как видно из данных, приведенных на рис. 6, трансфекция siPHK FOXC1 в эти клетки не предотвращала снижения уровня miR-204-5p (рис. 6), а через 72 ч после ее трансфекции регистрировали снижение пролиферативной активности клеток (табл. 1).


**Рис. 6.** Уровень G<sub>0</sub>-положительных клеток SK-MEL-2 до (*a*) и после ( $\delta$ ) обработки вемурафенибом: пожительные клетки локализованы в нижнем квадрате диаграмм. Уровень miR-204-5p в клетках SK-MEL-2 после обработки вемурафенибом (*в*) и трансфекции siPHK к FOXC1 (*г*).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее показано, что при меланоме, по сравнению с доброкачественными меланоцитарными невусами, сильно снижена экспрессия микроРНК miR-204-5p [5, 12]. Опираясь на данные по участию miR-204-5p в регуляции пролиферации клеток плоскоклеточного рака, рака молоч-

Таблица 1. Жизнеспособность обработанных вемурафенибом клеток меланомы SK-MEL-2, трансфицированных siPHK *FOXC1* 

Время, ч	Содержание жизнеспособных клеток <sup>а</sup> , %			
	siPHK <sub>sc</sub>	siPHK <i>FOXC1</i>		
24	$100.00\pm7.87$	$116.00 \pm 19.86$		
48	$100.00\pm21.20$	$127.60 \pm 36.64$		
72	$100.00\pm19.50$	$60.95\pm0.68^{\rm b}$		

<sup>а</sup>Жизнеспособность контрольных клеток (после воздействия вемурафениба) принята за 100%. Жизнеспособность этих же клеток, трансфицированных siPHK *FOXC1*, нормирована на контроль и выражена в процентах как среднее  $\pm$  SD. <sup>b</sup>p = 0.0024. ной железы [13, 14], мы предположили, что эта микроРНК участвует и в регуляции пролиферации клеток меланомы.

В результате проведенного биоинформатического анализа идентифицированы возможные гены-мишени miR-204-5p, вовлеченные в регуляцию пролиферации клеток. Один из таких генов -FOXC1. Кодируемый этим геном белок FOXC1 транскрипционный фактор, участвующий в развитии тканей и органов, включая кожу. Измененная экспрессия FOXC1 описана для клеток рака молочной железы [14], эндометрия [15], поджелудочной железы [16]. FOXC1 входит в семейство транскрипционных факторов forkhead box (FOX), представляющее собой группу эволюционно консервативных регуляторов транскрипции, имеюших обший ДНК-связывающий домен [17]. Члены этого семейства играют важную роль как в физиологических процессах, так и при канцерогенезе, влияя на метаболизм, развитие, дифференцировку, пролиферацию, апоптоз, миграцию и инвазию опухолевых клеток [18]. Также показано, что в клетках меланомы сигнальный каскад MST1R/PI3K/AKT активируется посредством избыточной экспрессии *FOXC1*, что приводит к усилению их пролиферации, миграции, инвазии [19]. Более того, известно, что FOXC1 регулирует формирование мезенхимальных ниш для гемопоэтических стволовых клеток [20].

Для доказательства функционирования FOXC1 в качестве регуляторной мишени miR-204-5р нами создана генетическая конструкция со встроенным фрагментом гена FOXC1. По результатам анализа люциферазной активности клеток, экспрессирующих ген-репортер и miR-204-5p, выявлено, что под действием miR-204-5р экспрессия белка-репортера снижается. Следовательно, miR-204-5p регулирует экспрессию FOXC1, по-видимому, связываясь с комплементарной последовательностью мРНК FOXC1. Следует заметить, что снижение люциферазной активности различалось в двух исследуемых типах клеток меланомы, но достоверно было не ниже 25%, на основании чего можно говорить о специфичности действия miR-204-5р. Таким образом, ген FOXC1 может быть мишенью и регулироваться miR-204-5p. Этот вывод подтвержден и результатами проведенного нами анализа влияния siPHK к FOXC1 на экспрессию miR-204-5p. Показано, что при трансфекции клеток меланомы siPHK к FOXC1 уровень miR-204-5р снижался, что может быть обусловлено присущей генам-мишеням способностью регулировать уровень экспрессии микроРНК по принципу обратной связи [21]. Таким образом, FOXC1 регулирует пролиферацию клеток меланомы, будучи, в свою очередь, функциональной мишенью miR-204-5p. Известно, что FOXC1, воздействуя на циклины CDK1, CDK2, CDK4 и CDK6. влияет на сигнальный каскад PI3K/AKT и тем самым на прохождение клеточного цикла [22].

Установлено, что снижение уровня FOXC1 вызывает угнетение пролиферации, а эктопическая экспрессия FOXC1 в опухолевых клетках индуцирует арест перехода из фазы G<sub>0</sub> в G<sub>1</sub> [23]. Для повышения доли клеток, находящихся в фазе  $G_0$ , мы использовали BRAF-негативные клетки, обработанные вемурафенибом. Показано, что вемурафениб индуцировал увеличение доли клеток. находящихся в состоянии покоя, что сопровождалось снижением экспрессии miR-204-5p. Этот результат согласуется с данными Vitiello и др. [24] о влиянии вемурафениба на экспрессию miR-204-5p. Авторы показали, что обработка вемурафенибом **BRAF**-негативных клеточных линий MeWo и SK-Mel-197 не приводила к повышению экспрессии miR-204-5p.

Следует сказать, что при сочетанном воздействии на клетки меланомы вемурафениба и siPHK к *FOXC1* снижался как уровень miR-204-5р, так и пролиферативная активность клеток. Это косвенно подтверждает наличие регуляторной взаимосвязи между микроPHK miR-204-5р и ее мишенью – FOXC1. Возможно, что при меланоме кожи miR-204-5p, воздействуя через экспрессию *FOXC1* на сигнальный каскад PI3K/AKT, модулирует активность циклинов и прохождение клеточного цикла, вовлечена в функционирование клеток, находящихся в состоянии покоя, препятствуя эффективному ответу на действие противоопухолевого препарата.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00110).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schardt J.A., Meyer M., Hartmann C.H., Schubert F., Schmidt-Kittler O., Fuhrmann C., Polzer B., Petronio M., Eils R., Klein C.A. (2005) Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell.* 8, 227–239.
- Lim P.K., Bliss S.A., Patel S.A., Taborga M., Dave M.A., Gregory L.A., Greco S.J., Bryan M., Patel P.S., Rameshwar P. (2011) Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res.* 71, 1550–1560.
- 3. Wang Z. (2010) MicroRNA: a matter of life or death. *World J. Biol. Chem.* **1**, 41–54.
- Chen Z., Li Z., Soutto M., Wang W., Piazuelo M.B., Zhu S., Guo Y., Maturana M.J., Corvalan A.H., Chen X., Xu Z., El-Rifai W. (2018) Integrated analysis of mouse and human gastric neoplasms identifies conserved microRNA networks in gastric carcinogenesis. *Gastroenterology*. 28, 46–52.
- 5. Аушев В.Н. (2015) МикроРНК: малые молекулы с большим значением. *Клин. онкогематол.* **8**, 1–12.
- Palkina N., Komina A., Aksenenko M., Moshev A., Savchenko A., Ruksha T. (2018) MiR-204 and miR-3065 exert antitumor effect on melanoma cells. *Oncol. Lett.* 15, 8269–8828.
- Toda H., Kurozumi S., Kijima Y., Idichi T., Shinden Y., Yamada Y., Arai T., Maemura K., Fujii T., Horiguchi J., Natsugoe S., Seki N. (2018) Molecular pathogenesis of triple-negative breast cancer based on microRNA expression signatures: antitumor miR-204-5p targets AP1S3. *Eur. J. Hum. Genet.* 63, 1197–1210.
- Díaz-Martínez M., Benito-Jardón L., Alonso L., Koetz-Ploch L., Hernando E., Teixidó J. (2018) miR-204-5p and miR-211-5p contribute to BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Res.* 78, 1017–1030.
- Li S., Kennedy M., Payne S., Kennedy K., Seewaldt V., Pizzo S., Bachelder E. (2014) Model of tumor dormancy/recurrence after short-term chemotherapy. *PLoS One*. 9(5), e98021.
- Ravnan M.C., Matalka M.S. (2012) Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation-positive advanced melanoma. *Clin. Ther.* 34(7), 1474–1486.
- Кудрявцев И.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Черешнев В.А. (2012) Проточная цитометрия в экспе-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

*риментальной биологии*. Екатеринбург: УрО РАН. 192 с.

- 12. Shellman M., Shellman Y. (2020) Human against machine? Machine learning identifies microRNA ratios as biomarkers for melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **140**, 18–20.
- Tang J., Li Z., Zhu Q., Wen W., Wang J., Xu J., Wu W., Zhu Y., Xu H., Chen L. (2020) miR-204-5p regulates cell proliferation, invasion, and apoptosis by targeting IL-11 in esophageal squamous cell carcinoma. *J. Cell. Physiol.* 235, 3043–3055.
- Hong B.S., Ryu H.S., Kim N., Kim J., Lee E., Moon H., Kim K.H., Jin M.S., Kwon N.H., Kim S., Kim D., Chung D.H., Jeong K., Kim K., Kim K.Y., Lee H.B., Han W., Yun J., Kim J.I., Noh D.Y., Moon H.G. (2019) Tumor suppressor miRNA-204-5p regulates growth, metastasis, and immune microenvironment remodeling in breast cancer. *Cancer Res.* 79, 1520–1534.
- Chung T., Lau T., Cheung T., Yim S., Lo K., Siu N., Chan L., Yu M., Kwong J., Doran G., Barroilhet L., Ng A.S., Wong R., Wang V., Mok S., Smith D., Berkowitz R., Wong Y. (2012) Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1. *Int. J. Cancer.* 130, 1036–1045.
- Subramani R., Camacho F., Levin C., Flores K., Clift F., Galvez A., Terres M., Rivera S., Kolli S., Dodderer J., Miranda M., Rodriguez A., Pedroza D., Chatterjee A., Lakshmanaswamy R. (2018) FOXC1 plays a crucial role in the growth of pancreatic cancer. *Oncogenesis*. 7, 52–63.
- Myatt S.S., Lam E.W. (2007) The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 7, 847–859.
- Lai E., Prezioso V.R., Smith E., Litvin O., Costa R.H., Darnell J.E. (1990) HNF-3A, a hepatocyte-enriched

transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally. *Genes Dev.* **4**, 1427–1436.

- Wang J., Li L., Liu S., Zhao Y., Wang L., Du G. (2016) FOXC1 promotes melanoma by activating MST1R/PI3K/AKT pathway and is associated with poor prognosis in melanoma. *Oncotarget*. 7, 375–387.
- Omatsu Y., Seike M., Sugiyama T., Kume T., Nagasawa T. (2014) Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation. *Nature*. 508, 536–540.
- Gulyaeva L.F., Kushlinskiy N.E. (2016) Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J. Transl. Med.* 14, 143.
- Liu Y., Miao Y., Gao X., Wang Y.Y., Wang H., Zheng Y.W., Zhao Z.Y. (2018) MicroRNA-200a affects the proliferation of airway smooth muscle cells and airway remodeling by targeting FOXC1 via the PI3K/AKT signaling pathway in ovalbumin-induced asthmatic mice. *Cell. Physiol. Biochem.* 50, 2365–2389.
- Zhou Y., Kato H., Asanoma K., Kondo H., Arima T., Kato K., Matsuda T., Wake N. (2002) Identification of FOXC1 as a TGF-β1 responsive gene and its involvement in negative regulation of cell growth. *Genomics*. 80, 465–472.
- Vitiello M., Tuccoli A., D'Aurizio R., Sarti S., Giannecchini L., Lubrano S., Marranci A., Evangelista M., Peppicelli S., Ippolito C., Barravecchia I., Guzzolino E., Montagnani V., Gowen M., Mercoledi E., Mercatanti A., Comelli L., Gurrieri S., Wu L.W., Ope O., Flaherty K., Boland G.M., Hammond M.R., Kwong L., Chiariello M., Stecca B., Zhang G., Salvetti A., Angeloni D., Pitto L., Calorini L., Chiorino G., Pellegrini M., Herlyn M., Osman I., Poliseno L. (2017) Context-dependent miR-204 and miR-211 affect the biological properties of amelanotic and melanotic melanoma cells. *Oncotarget.* 8, 25395–25417.

## *FOXC1*-MEDIATED EFFECTS OF miR-204-5p ON MELANOMA CELL PROLIFERATION

I. Yu. Dubovtseva<sup>1</sup>, M. B. Aleksenenko<sup>1</sup>, E. D. Nikolaeva<sup>1</sup>, A. S. Averchuk<sup>1</sup>, A. V. Moshev<sup>3</sup>, A. A. Savchenko<sup>3</sup>, S. V. Markova<sup>2</sup>, and T. G. Ruksha<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Krasnoyarsk, 660022 Russia

<sup>2</sup>Institute of Biophysics, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", Krasnoyarsk, 660022 Russia

> <sup>3</sup>Research Institute for Medical Problems in the North, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660022 Russia

> > \*e-mail: tatyana\_ruksha@mail.ru

MicroRNAs epigenetically regulate gene expression and, therefore, are participating in various physiological and pathological processes. In melanoma cells, miR-204-5p is expressed at very low levels. Previously we showed that the restoration of miR-204-5p expression results in changes in melanoma cells proliferation, migration, and invasion. By bioinformatics analysis, we revealed that miR-204-5p targets mRNA encoding transcriptional factor FOXC1. Luciferase assay showed that miR-204-5p represses *FOXC1* expression. Transfection with the siRNA to *FOXC1* leads to down-regulation of miR-204-5p, forming a negative feedback between the microRNA and its target gene. Another effect of the *FOXC1* siRNA transfection was a decrease in melanoma cell proliferation evident from the results of MTT-test and fluorescent microscopy. The increase of  $G_0/G_1$  positive cells ratio is accomplished with regulation pattern between miR-204-5p and *FOXC1* remaining unchanged. Taken together, our findings indicate that miR-204-5p may affect melanoma cell proliferation through its effects on *FOXC1*.

Keywords: FOXC1, miR-204-5p, melanoma, siRNA, miRNA, quiescent cancer cells

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

УДК 577.2:616\_-006

## ФАКТОР РОСТА ЭПИДЕРМИСА УЧАСТВУЕТ В ПОВЫШЕНИИ ЭКСПРЕССИИ ОНКОГЕНА *URGCP* В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ ЧЕЛОВЕКА<sup>1</sup>

© 2021 г. Е. Токау\*

Department of Molecular Biology and Genetics, Project Coordination Office, Balıkesir University, Balıkesir, 10145 Turkey \*e-mail: esratokay@balikesir.edu.tr

Поступила в редакцию 01.07.2020 г. После доработки 16.11.2020 г. Принята к публикации 18.11.2020 г.

Гепатоцеллюлярная карцинома занимает четвертое место в структуре смертности от злокачественных опухолей в мире. Важную роль в канцерогенезе печени играет сигнальный путь рецептора фактора роста эпидермиса (EGFR). В микроокружении злокачественных опухолей печени наблюдается аберрантная экспрессия фактора роста эпидермиса (EGF). Изучена EGF-зависимая регуляция гена URGCP в клетках гепатомы человека (Hep3B). С помощью метода МТТ показано влияние цитокина EGF на пролиферацию клеток Hep3B. С помощью количественной ПЦР в реальном времени и вестерн-блотинга показано участие EGF в экспрессии URGCP на уровне мРНК и белка. Конструкциями, содержащими промоторы гена URGCP различной длины, транзиентно трансфицировали клетки Hep3B и определяли в них базальную активность промоторов в присутствии EGF. С целью изучения механизма EGF-опосредованной положительной регуляции гена URGCP проанализированы некоторые сигнальные пути. Экспрессия URGCP увеличивается в зависимости от концентрации EGF и времени воздействия. Опосредованное EGF повышение экспрессии URGCP может зависеть от *цис*-действующего элемента в промоторе этого гена (положение  $-344 \dots -482$ ).

**Ключевые слова:** EGF, Hep3B, URGCP, регуляция транскрипции **DOI:** 10.31857/S0026898421040133

#### введение

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), занимающая четвертое место в структуре смертности от злокачественных заболеваний, ежегодно диагностируется более чем у 500000 человек во всем мире. ГЦК относится в быстрорастущим опухолям [1-3]. Факторы роста и их рецепторы играют важную роль в процессах развития тканей и заживления ран [4, 5]. Нарушение регуляции сигнальных каскадов, инициируемых факторами роста. включая каскал фактора роста эпидермиса (EGF) и его рецептора (EGFR), влияет на прогрессию многих видов рака [6, 7]. Так, сигнальные пути EGFR и Нірро вовлечены в канцерогенез ГЦК [8]. В частности, во внутрипеченочном микроокружении ГЦК наблюдается аберрантная экспрессия EGF [3, 9-11].

В ГЦК выявлена не только экспрессия генов, кодирующих EGF и EGFR, но также и сверхэкспрессия онкогена *URGCP* [12]. Сверхэкспрессия *URGCP* стимулирует экспрессию мРНК циклина D1 в клетках HepG2, тогда как сайленсинг *URGCP*, опосредованный PHK-интерференцией, приводит к снижению экспрессии мРНК циклина D1 [13]. Кроме того, экспрессия *URGCP* повышена в опухолях различного типа, таких как рак желудка, остеосаркома, лейкоз и немелкоклеточный рак легкого [14]. Тем не менее, механизмы регуляции этого онкогена недостаточно изучены. Ранее мы сообщали, что экспрессию гена *URGCP* индуцируют цитокины TGF-β и TNF-α [15, 16].

Нами изучено влияние EGF на экспрессию URGCP и ее транскрипционную регуляцию в клетках Нер3В. Уровни экспрессии URGCP определяли на уровне мРНК и белка с помощью количественной ПЦР в реальном времени и вестернблотинга соответственно. Четырьмя различными конструкциями, содержащими укороченные с 5'конца промоторные области гена URGCP, транзиентно трансфицировали клетки Нер3В и определяли EGF-опосредованную транскрипционную активность этих конструкций. Для блокирования некоторых сигнальных каскадов и понимания механизмов регуляции экспрессии, опосредованной EGF, использовали несколько селективных ингибиторов сигнальных путей. Представленная работа может внести вклад в понимание механизма EGF-опосредованной регуляции URGCP при ГЦК. Данные о EGF-опосредованной регуляции

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Статья представлена на английском языке.

*URGCP* могут быть полезными для поиска новых терапевтических мишеней ГЦК.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы. В работе использовали: рекомбинантный EGF человека фирмы "Cell Signaling Technology" (США); антитела к URGCP ("Abcam" (ab103323), Великобритания) и к β-актину ("Sigma Aldrich" (sc-81178), США); Ready-To-Glow<sup>™</sup> Dual Secreted Reporter Assay (Cat no: 631734) приобретен у "Clontech" (США). Праймеры получены в "Macrogen" (Ю. Корея), вортманнин (ингибитор PI3K, 9951) и PD98059 (ингибитор MEK-1, 9900 S) — в "Cell Signaling Technology". Использовали также ингибитор Р38 PD169316 (P-9248) фирмы "Sigma Aldrich"; SP600125 (Sc-200635, ингибитор JNK) и ингибитор Nfkb Bay-117085 (CAS 196309-76-9) фирмы "Santa-Cruz" (США); набор для выделения РНК (Total RNA isolation Kit) компании "Fermentas" (США).

Культура клеток. Клеточная линия ГЦК человека (Нер3В) предоставлена Dipak Ramji (Cardiff University). Клетки Нер3В культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы, дополненной 10%-ной эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота ("Gibco", США) и 5 мМ глутамином ("Sigma Aldrich") при 5% СО<sub>2</sub> и 37°С. Клетки подвергали сывороточной депривации с использованием 0.1% БСА (бычий сывороточный альбумин, "Sigma Aldrich") в течение 1 ч до добавления EGF.

Анализ клеточной пролиферации. Влияние EGF на клеточную пролиферацию Нер3В определяли с использованием MTT-теста ("Sigma Aldrich"). Клетки Нер3В высевали в 96-луночные планшеты ( $3 \times 10^4$  клеток/лунка), затем обрабатывали EGF (0, 10, 20 и 40 нг/мл) в течение 24 и 48 ч с последующей инкубацией с реагентом MTT (20 мкл/лунка) в течение 4 ч. Оптическую плотность (OD) измеряли при 550 нм с помощью Thermo Microplate Reader [15, 17].

Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с помощью набора GeneJET RNA purification kit ("Thermo Scientific<sup>TM</sup>", США, Cat по: K0732) и количественно определяли с помощью системы Qubit. Первую цепь кДНК синтезировали, используя 1000 нг суммарной РНК, в соответствии с протоколом для ПЦР в реальном времени (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, "Thermo Scientific<sup>TM</sup>", Cat по: K1622). Использовали следующие праймеры для мРНК URGCP (GeneBank NM\_017920) (F – CTT CAT CCT GAG TCC CTA CCG; R – GCC GTT CTG CTG CAT TCG) и β2-микроглобулина человека (Hβ-2F – TTT CTG GCC TGG AGG CTA TC; HB-2 R - CAT GTC TCG ATC CCA СТТ ААС Т). мРНК β-микроглобулина человека лобавляли в кажлый образен в качестве внутреннего контроля. Количественное определение генов-мишеней и референсных генов (β-микроглобулин человека) проводили в трех повторах с помощью прибора Light Cycler H480. ПЦР в реальном времени проводили в общем объеме 10 мкл (1 мкл кДНК, 0.5 мкл каждой пары праймеров (100 пмоль/мкл), 5 мкл Light Cycler-Fast-Start DNA Master SYBR Green I mix ("Roche", Швейцария). Условия реакции в термоциклере включали начальную денатурацию при 95°С (3 мин), за которой следовали 35 циклов при 95°С (30 c), 55°С (30 с) и 72°С (30 с). Уровни экспрессии определяли методом  $\Delta\Delta$ СТ для целевого гена [18].

Анализ сигнальных путей. Клетки Нер3В высевали по  $2 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup> в культуральный флакон плошалью 25 см<sup>2</sup>. Клетки подвергали сывороточному голоданию, используя БСА в конечной концентрации 0.1%, перед обработкой цитокинами и ингибиторами. Ингибиторы, включая ингибитор МАРК, Mek-1, ингибитор p38, PD169316. ингибитор JNK, SP600125 и ингибитор NF-кВ, Bay-117085, добавляли в культуральные флаконы до конечной концентрации 10 мкМ после инкубации в течение 24 ч. Кроме того, использовали вортманнин – ингибитор РІЗК, в концентрации 1 мкМ. После инкубации в течение 30 мин к клеткам добавляли цитокин EGF (40 нг/мл). Осадок клеток собирали после инкубации в течение 6 ч для выделения РНК и белка [15].

Вестерн-блотинг. Клетки лизировали с использованием буфера Laemmli. Вестерн-блот-анализ проводили согласно Tokay и Kockar [15]. Концентрация антител против URG4 составляла 1 : 100 (об./об.); загрузку образцов контролировали с использованием антител к β-актину в концентрации 1 : 1000 (об./об.).

Транзиентная трансфекция промоторных конструкций. Клетки, культивируемые во флаконах площадью 25 см<sup>2</sup>, трансфицировали четырьмя конструкциями (10 мкг), содержащими промоторные области гена URGCP разной длины (-109...+63/рМЕТ (Р1), -261...+63/рМЕТ (Р2), -344...+63/pMET (P3) и -482...+63/pMET (P4)), клонированные ранее в репортерный вектор pMetLuc, содержащий ген люциферазы, как описано ранее [19]. Клетки инкубировали в течение 24 ч, а затем высевали в 96-луночные планшеты  $(по 3 \times 10^4$ клеток на лунку). Через 24 ч в лунки добавляли EGF и ингибиторы сигнальных путей в указанных выше концентрациях. Клетки подвергали сывороточному голоданию за 1 ч до обработки EGF и ингибиторами. Для определения активности люциферазы среду удаляли после инкубации клеток в течение 6 ч. С целью контроля эффективности трансфекции клетки трансфици-



**Рис. 1.** Влияние EGF на пролиферацию клеток Hep3B при нормальном содержании сыворотки (*a*) и в состоянии сывороточного голодания (МТТ-анализ) (*б*). Клетки рассевали на 96-луночные планшеты (30000 клеток/лунка). После инкубации в течение 24 ч в лунки добавляли EGF – 10, 20 и 40 нг/мл. Сывороточную депривацию с использованием 0.1% БСА проводили в течение 24 ч до добавления EGF. После инкубации в течение 24 и 48 ч измеряли поглощение при 550 нм. Представленные данные репрезентативны по трем независимым экспериментам. Показано стандартное отклонение, вычисленное по трем повторностям. Значения *p* получены с помощью *t*-теста в результате сравнения с контрольными (необработанными) клетками, \**p* < 0.05 считали статистически значимыми. Здесь и далее БО – клетки без обработки.

ровали также контрольным вектором pMetLuc (2 мкг), экспрессирующим ген люциферазы.

Активность репортерных конструкций. Активность люциферазы определяли с использованием набора для анализа секретируемой люциферазы ("Clontech", США), измерения проводили на люминометре (Fluoraskan Ascent FL, "Thermo Fisher Scintific") в соответствии с опубликованным ранее протоколом [20]. Эксперименты повторяли не менее 3 раз.

Статистический анализ. Результаты выражали как среднее ± стандартное отклонение (SD), вычисленные по трем независимым экспериментам. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.0 для Windows и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### EGF влияет на пролиферацию клеток Hep3B в зависимости от сывороточных условий

Влияние EGF на пролиферацию клеток Hep3B определяли с помощью MTT-теста. Клетки высевали на 96-луночные планшеты. Через 24 ч добавляли EGF в конечной концентрации 10, 20 и 40 нг/мл. MTT-анализ проводили через 24 и 48 ч. Результаты представлены на рис. 1*а.* Хорошо видно, что в использованных нами условиях (24 и 48 ч, нормальное содержание сыворотки) EGF не влиял на пролиферацию клеток Hep3B. В случае сывороточного голодания клетки подвергали сывороточной депривации, добавляя 0.1% БСА за 1 ч до внесения EGF. Как показано на рис. 16, EGF в концентрации 40 нг/мл повышал пролиферацию клеток через 48 ч после обработки.

#### EGF повышает экспрессию URGCP на уровне мРНК и белка в зависимости от концентрации и времени

Влияние EGF на экспрессию URGCP определяли на уровне мРНК и белка с использованием технологии количественной ПЦР в реальном времени и вестерн-блотинга. Клетки высевали во флакон, а затем в условиях сывороточного голодания добавляли EGF в концентрации 20 и 40 нг/мл. Из рис. 2а видно, что обработка клеток EGF (20 нг/мл) в течение 24 и 48 ч приводила к повышению экспрессии URGCP примерно в 3 и 2.5 раза соответственно. Кроме того, через 48 ч стимулирующий эффект EGF в концентрации 40 нг/мл усиливался примерно в 4.5 раза. Стимуляцию экспрессии белка URGCP подтверждали методом вестерн-блотинга. Обнаружено, что воздействие EGF в концентрации 40 нг/мл в течение 48 ч приводило к повышению экспрессии белка URGCP примерно в 2 раза (рис. 2б).

## EGF-опосредованная регуляция URGCP контролируется через путь p38/MAPK

Механизм положительной регуляции URGCP изучали с помощью анализа сигнальных путей в присутствии EGF с использованием селективных ингибиторов. Транскрипционный уровень URGCP определяли в клетках Hep3B, транзиентно трансфицированных Ca-фосфатным методом четырь-



**Рис. 2.** Определение EGF-опосредованной экспрессии *URGCP* в клетках Нер3В на уровне мРНК и белка. *а* – Уровень мРНК URGCP определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Гистограммы строили с помощью программы Graphpad Prism 7.0. Изменение уровня мРНК рассчитывали методом  $\Delta\Delta$ Ct. Приведены результаты, вычисленные по трем независимым репрезентативным экспериментам. Показано стандартное отклонение для трех повторов. Значения *p* получены с помощью *t*-теста. \**p* < 0.05 считали статистически значимыми. *б* – Вестерн-блот-анализ эксперсии белка URGCP. В качестве внутреннего контроля использовали β-актин. Денситометрические определения проводили с помощью программы Image J.

мя различными промоторными конструкциями гена URGCP. Добавляли ингибиторы и цитокин EGF и инкубировали в течение 6 ч. После этого собирали среду культивирования и определяли в ней люциферазную активность с использованием системы анализа секретируемой люциферазы. Из рис. 36 видно, что EGF значительно повышает активность промотора Р4 (почти в 1.2 раза) по сравнению с его базальной активностью. Уровень мРНК определяли, проводя количественную ПЦР на кДНК-матрице из клеток, обработанных селективными ингибиторами и цитокином EGF. Из рис. 3*в* видно, что ингибитор PD169316 значительно снижает уровень мРНК URGCP в клетках, обработанных EGF. Показано также, что упомянутые ингибиторы не снижают существенно активность промотора P4 (рис. 3г). Таким образом, мы можем сделать вывод, что EGF-опосредованная экспрессия *URGCP* не регулируется участком –482...+63 промотора *URGCP*.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее показали, что экспрессия EGF в ГЦК значительно выше, чем в нормальных тканях [21]. Высокий уровень экспрессии EGF способствует миграции и инвазии ряда опухолевых клеток, включая клетки ГЦК [22]. Мы проверили, может



**Рис. 3.** Влияние специфических ингибиторов сигнальных путей и цитокина EGF на уровень мРНК в клетках Hep3B и на активность промоторных конструкций. Люциферазную активность промоторных конструкций *URGCP* определяли с помощью люминометра. Ингибиторы сигнальных путей (вортманнин (wort), MEK1, NF-кB, SP600125 (SP600) и PD169316 (PD)) были добавлены к клеткам Hep3B для определения регуляторных участков промотора *URGCP*. Гистограммы строили с помощью программы Graphpad Prism 7.0. Данные репрезентативны для трех независимых экспериментов. Показано стандартное отклонение для трех повторов. \*p < 0.05 считали статистически значимыми.

ли стимуляция EGF влиять на экспрессию гена *URGCP* в клетках гепатомы Hep3B. Huang и Xu показали, что стимуляция клеток HepG2 и HC-CLM3 цитокином EGF (50 и 100 нг/мл) приводит к значительному увеличению пролиферации [23]. Однако, как показано в МТТ-тесте, EGF в концентрации 20 и 40 нг/мл не подавлял пролиферацию клеток Hep3B в течение 24 и 48 ч в условиях нормального содержания сыворотки. При сывороточном голодании EGF в концентрации 40 нг/мл индуцировал пролиферацию клеток Hep3B в течение 48 ч. Эти результаты соответствуют данным [23]. Влияние EGF на пролиферацию клеток имеет временную и концентрационную зависимость. Нас особенно интересовало, влияет ли воздействие EGF на уровни экспрессии URGCP, обычно повышенные в тканях ГЦК, параллельно с уровнями HBхAg (антиген вируса гепатита В) [13]. URGCP способствует пролиферации клеток ГЦК путем воздействия на ген циклина D1 [13]. В клетках Нер3В, подвергнутых 48-часовому воздействию EGF, уровни URGCP были значительно выше, чем в необработанных клетках. Реагирует ли специфический промоторный участок URGCP на EGF? Чтобы ответить на этот вопрос, определили транскрипционный уровень гена URGCP, обеспечиваемый четырьмя различными промоторными конструкциями, укороченными с 5'-конца. Значительное повышение активности промотора Р4 под действием EGF указывает на возможное присутствие в участке, охватывающем область –344...–482, сайтов связывания факторов транскрипции, активируемых воздействием EGF.

Установлено, что сигнальные пути EGFR и Нірро играют важную роль в канцерогенезе ГЦК [24]. Механизм повышения экспрессии URGCP под действием EGF изучали с использованием нескольких ингибиторов сигнальных путей, таких как вортманнин (ингибитор PI3K), PD98059 (ингибитор MEK-1), SP600125 (ингибитор JNK) и Вау-117085 (ингибитор NF-кВ). Димеризация EGFR активировала три основных нисходящих сигнальных пути – Ras/Raf/MEK/ERK/MAPK, PI3K/AKT (PKB) и JAK/STAT [25]. Каскады MAPK также включали киназу р38. Результаты нашей работы показывают, что EGF усиливает экспрессию URGCP на уровне мРНК через путь p38/MAPK. Подробно изучено, влияет ли ингибитор р38/МАРК на повышение активности промотора Р4. Установлено, что люциферазная активность конструкции Р4 не снижалась в присутствии PD169316 (ингибитор р38) в отличие от уровня мРНК. В этих условиях EGF-опосредованная регуляция URGCP не могла контролироваться использованными конструкциями. В нашей работе впервые изучено повышение транскрипции гена URGCP, опосредованное EGF.

Опосредованная EGF регуляция *URGCP* может быть ответственной за процесс метастазирования ГЦК. Однако для подтверждения этого предположения необходимы дополнительные исследования. Результаты нашей работы позволят лучше понять механизмы EGF-опосредованной регуляции *URGCP*.

Автор выражает глубокую благодарность Feray Köçkar, Ph.D, которая значительно помогла исследованиям своим опытом, а также Deniz Karayağmurlu, Bsc, за вклад в изучение клеточных культур.

Дизайн исследования, сбор данных, их анализ и интерпретация, подготовка рукописи и ее редактирование выполнены Esra Tokay.

Автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fuchs B.C., Hoshida Y., Fuji T., Wei L., Yamada S., Lauwers G.Y., McGinn C.M., DePeralta D.K., Chen X., Kuroda T., Lanuti M., Schmitt A.D., Gupta S., Crenshaw A., Onofrio R., Taylor B., Winckler W., Bardeesy N., Caravan P., Golub T.R., Tanabe K.K. (2014) Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 59(4), 1577–1590.
- Huang P., Xu X., Wang L., Zhu B., Wang X., Xia J. (2014) The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment. J. Cell. Mol. Med., 18(2), 218–230.
- Liu Z.C., Ning F., Wang H.F., Chen D.-Y., Cai Y.-N., Sheng H.-Y., Lash G.E., Liu L., Du J. (2017) Epider-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

mal growth factor and tumor necrosis factor  $\alpha$  cooperatively promote the motility of hepatocellular carcinoma cell lines via synergistic induction of fibronectin by NF- $\kappa$ B/p65. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1861**(11PtA), 2568–2582.

https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.010

- Nikolova D., Chalovska V., Ivanova M.G., Nikolovska E., Volkanovska A., Orovchanec N., Kunovska S.K., Petrushevska G., Janevska V. (2018) Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma. *Pril. (Makedon. Akad. Nauk Umet. Odd Med. Nauki)*. 39(2–3), 21–28.
- Xia H., Dai X., Yu H., Zhou S., Fan Z., Wei G., Tang Q., Gong Q., Bi F. (2018) EGFR-PI3K-PDK1 pathway regulates YAP signaling in hepatocellular carcinoma: the mechanism and its implications in targeted therapy. *Cell Death Dis.* 9(3), 269. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0302-x
- Wang W., Ma X.P., Shi Z., Zhang P., Ding D.-L., Huang H.-X., Saiyin H.G., Chen T.Y., Lu P.-X., Wang N.-J., Yu H., Sun J., Zheng S.L., Yu L., Xu J., Jiang D.-K. (2014) Epidermal growth factor receptor pathway polymorphisms and the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* 5(1), 396–410.
- Chen B., Wei W., Ma L., Yang B., Gill R.M., Chua M.-S., Butte A.J., So S. (2017) Computational discovery of niclosamide ethanolamine, a repurposed drug candidate that reduces growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in mice by inhibiting cell division cycle 37 signaling. *Gastroenterology*. **152**(8), 2022–2036.
- Lu W.C., Kao S.Y., Yang C.C., Tu H.-F., Wu C.-H., Chang K.-W., Lin S.-C. (2014) Affiliations expandE-GF up-regulates miR-31 through the C/EBPβ signal cascade in oral carcinoma. *PLoS One.* 9(9), e108049.
- Hung W., Yang M., Chang C., Tsai J., Chuang L. (1995) Differential regulation of EGF production, EGF receptor-binding, and cellular growth by sodiumbutyrate in hep3b and plc/prf/5 human hepatomacells. *Intern. J. Oncology.* 7(5), 1089–1093.
- Fan F.T., Shen C.S., Tao L., Tian C., Liu Z.-G., Zhu Z.-J., Liu Y.-P., Pei C.-S., Wu H.-Y., Zhang L., Wang A.-Y., Zheng S.-Z., Huang S.-L., Lu Y. (2014) PKM2 regulates hepatocellular carcinoma cell epithelial-mesenchymal transition and migration upon EGFR activation. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15(5), 1961–1970.
- Yan F., Bai L.P., Gao H., Zhu C.-M., Lin L., Kang X.-P. (2014) EGF reverses multi-drug resistance via the p-ERK pathway in HepG2/ADM and SMMC7721/ ADM hepatocellular carcinoma models. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15(6), 2619–2623.
- Tufan N.L., Lian Z., Liu J., Pan J., Arbuthnot P., Kew M., Clayton M.M., Zhu M., Feitelson M.A. (2002). Hepatitis Bx antigen stimulates expression of a novel cellular gene, URG4, that promotes hepatocellular growth and survival. *Neoplasia*. 4(4), 355–368.
- Satiroglu-Tufan N.L., Dodurga Y., Gok D., Cetinkaya A., Feitelson M.A. (2010) RNA interferencemediated URG4 gene silencing diminishes cyclin D1 mRNA expression in HepG2 cells. *Genet. Mol. Res.* 9(3), 1557–1567.
- Dodurga Y., Seçme M., Şatıroğlu-Tufan N.L. (2018) A novel oncogene URG4/URGCP and its role in cancer. Gene. 668, 12–17.

- 15. Tokay E., Kockar F. (2016) Identification of intracellular pathways through which TGF- $\beta$ 1 upregulates *URG-4/URGCP* gene expression in hepatoma cells. *Life Science.* **144**, 121–128.
- 16. Tokay E., Sagkan R.I., Kockar F. (2020) TNF-α induces URG-4/URGCP gene expression in hepatoma cells through starvation dependent manner. Biochem. Genet. 59(1), 300–314.59. https://doi.org/10.1007/s10528-020-09972-z
- Alper M., Kockar F. (2014) IL-6 upregulates a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 (ADAMTS-2) in human osteosarcoma cells mediated by JNK pathway, *Mol. Cell. Biochemistry*. 393(1–2), 165–175.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 25(4), 402–408.
- Tokay E., Kockar F. (2016) SP1 is a transcriptional regulator of URG-4/URGCP gene in hepatocytes. Mol. Cell. Biochem. 423(1-2), 75-83.
- 20. Turkoglu S.A., Kockar F. (2016) SP1 and USF differentially regulate ADAMTS1 gene expression under

normoxic and hypoxic conditions in hepatoma cells. *Gene.* 575, 48–57.

- Geng J., Li X., Lang X., Qiao C., Hu M., Yang J., Feng J., Lv M. (2014) Combination of cetuximab and rapamycin enhances the therapeutic efficacy in hepatocellular carcinoma. *Technol. Cancer Res. Treat.* 13(4), 377–385.
- 22. Shehata F., Abdel M.N., Sakr M., Kasem S., Balbaa M. (2013) Epidermal growth factor, its receptor and transforming growth factor- $\beta$ 1 in the diagnosis of HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol.* **30**(3), 673.

https://doi.org/10.1007/s12032-013-0673-x

- 23. Huang P., Xu X.X. (2014) The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment. *J. Cell. Mol. Med.* **18**(2), 218–230.
- 24. Xia H., Dai X., Yu H., Zhou S., Fan Z., Wei G., Tang Q., Gong Q., Bi F. (2018) EGFR-PI3K-PDK1 pathway regulates YAP signaling in hepatocellular carcinoma: the mechanism and its implications in targeted therapy. *Cell Death Dis.* 9(3), 269.
- Wee P., Wang Z. (2017) Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathway. *Cancers* (Basel). 9(5), 52.

## EPIDERMAL GROWTH FACTOR MEDIATES Up-REGULATION OF URGCP ONCOGENE IN HUMAN HEPATOMA CANCER CELLS

#### E. Tokay\*

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Project Coordination Office, Balıkesir University, Balıkesir, Turkey \*e-mail: esratokay@balikesir.edu.tr

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fourth leading cause of cancer-related death in the World. Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway plays an important role in HCC tumorigenesis. In the tumor microenvironment of HCC, the expression of EGF is aberrant. Here we describe the EGF-dependent regulation of *URGCP* gene in human hepatoma cancer cells (Hep3B). The effect of EGF cytokine on Hep3B proliferation was shown using MTT method. EGF-mediated URGCP expression was determined at mRNA and protein level with qRT-PCR analyses and Western blotting method, respectively. Different lengths of *URGCP* promoter constructs were transient transfected in to Hep3B cells and the basal promoter activities were determined in the presence of EGF. In addition, some pathway analyses were performed to find out the mechanism of EGF mediated up-regulation of the *URGCP* gene. In the presence of EGF, *URGCP* expression increases in concentration and time dependent manner. EGF mediated *URGCP* up-regulation might depend on a *cis*-acting element located between -344 and -482 positions in its promoter.

Keywords: EGF, Hep3B, URGCP, upregulation, transcriptional regulation

#### ——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 577:576.3:615

## ВЛИЯНИЕ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА НАКОПЛЕНИЕ ЛИПИДОВ, АКТИВАЦИЮ ЛИЗОСОМ И СДВИГ МЕТАБОЛИЗМА РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК В СТОРОНУ ГЛИКОЛИЗА

© 2021 г. Х. С. Вишнякова<sup>*a*</sup>, К. В. Попов<sup>*a*</sup>, Х. Рап<sup>*a*</sup>, М. В. Ясько<sup>*a*</sup>, Е. Е. Егоров<sup>*a*</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

\**e-mail: yegorov58@gmail.com* Поступила в редакцию 08.12.2020 г. После доработки 18.01.2021 г. Принята к публикации 21.01.2021 г.

Любые гидрофобные молекулы, присутствующие в избытке, становятся опасными для клеток, поскольку растворяются в мембранах и нарушают их функции. Данные о влиянии свободных жирных кислот (СЖК) на клетки достаточно противоречивы. В представленной работе изучено действие СЖК на различные клетки человека в культуре. Показано, что добавление СЖК с длинной цепью (олеиновой, пальмитиновой, линолевой, линоленовой и др.) вызывает разнообразные эффекты в культивируемых клетках различного типа. В клетках (прежде всего в гепатоцитах и мышечных клетках) начинают накапливаться липиды, в них активируется первый этап аутофагии (активация лизосом) и происходит разобщение окислительного фосфорилирования. Хотя потребление кислорода клетками увеличивается, их энергетический метаболизм сдвигается в пользу гликолиза. Все эти эффекты выражены в разной степени в разных клетках и при добавлении разных СЖК. Обсуждаются механизмы действия СЖК, а также возможные биологические и медицинские приложения полученных результатов.

**Ключевые слова:** свободные жирные кислоты, метаболическое репрограммирование, культура клеток, гликолиз, дыхание, разобщение окислительного фосфорилирования

DOI: 10.31857/S0026898421040145

#### введение

Липиды вообще и свободные жирные кислоты (СЖК) в частности обладают плохой растворимостью в воде и перемещаются внутри организма с помощью различных переносчиков, таких как хиломикроны, липопротеиды различной плотности, альбумин и липидсвязывающие белки.

До открытия пенициллина СЖК рассматривали как перспективные антибиотики. Антимикробное действие СЖК против возбудителя сибирской язвы обнаружил еще Роберт Кох в 1890 г. [1]. И в наше время продолжается изучение антимикробных эффектов жирных кислот, причем отмечается практическая невозможность возникновения у микробов резистентности к СЖК [2].

Считается, что основной антимикробный эффект СЖК связан с модификацией мембран. Описывают как прямое детергентное действие, так и модификации мембран, приводящие к нарушению дыхания и подавлению энергетики [3]. Эндогенные СЖК участвуют в антимикробной защите организма [4], а также широко используются в составе кремов для подавления роста грибков и лечения акне. Механизмы действия СЖК на клетки человека чрезвычайно многообразны. Во-первых, СЖК – это высокоэнергетический субстрат, который подвергается бета-окислению и "питает" (ацетатом) цикл Кребса. Во-вторых, СЖК становятся готовыми блоками для синтеза фосфолипидов и триглицеридов. Организм человека "экономит" усилия, и часто жирные кислоты, поступившие с пищей, полностью входят в состав более сложных липидов [5]. Эта экономия способна модифицировать свойства мембран, изменяя их жирнокислотный состав.

СЖК входят в состав липидов, обладающих высокой биологической активностью: диацилглицеридов (вторичных посредников) и лизофосфатидных кислот (липидных гормонов, действие которых опосредуется рецепторами) [6].

СЖК являются лигандами рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR, peroxisome proliferator-activated receptors), которые, в свою очередь, влияют на энергетический метаболизм, регулируя обмен глюкозы и биогенез митохондрий через индукцию транскрипционных факторов FOXO1 и PGC1-α. Известен ряд ядерных рецепторов, взаимодействующих с СЖК: LXR (печеночный рецептор X, liver-X receptor), FXR (рецептор X фарнезоида, farnesoid-X receptor), RAR (рецептор ретиноевой кислоты, retinoic acid receptor), VDR (рецептор витамина D, vitamin D receptor), TR (рецептор тиреоидного гормона, thyroid hormone receptor), HNF4a (ядерный фактор гепатоцитов 4a, Hepatocyte nuclear factor 4a). На поверхности клеток находятся сопряженные с G-белками рецепторы, узнающие СЖК (GPR40 и GPR120) [7].

До 2018 года даже полагали, что пальмитат активирует TLR4, однако оказалось, что это не так [8].

Жирные кислоты являются предшественниками огромного семейства простаноидов (простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов, резолвинов и др.), включающего тысячи соединений, ключевых регуляторов (индукторов и "завершателей") воспаления [9]. Подавляющее большинство используемых сегодня противовоспалительных лекарств (аспирин, парацетамол, ибупрофен, индометацин и др.) это, по сути, ингибиторы образования простаноидов из СЖК. Один из механизмов действия глюкокортикоидов (дексаметазона) состоит в усилении экспрессии аннексинов, которые снижают доступность фосфолипидов для фосфолипаз А2 – ферментов, производящих сырье для простаноидов.

Данные об эффектах СЖК на клетки человека крайне противоречивы. Прежде всего, следует отметить существенные различия во влиянии СЖК на клетки разной дифференцировки [10–12]. Возможно, что многие противоречия обусловлены различиями в условиях экспериментов и в переносе данных, полученных в одной модели, на другую (работы на выделенных митохондриях, на клетках, *in vivo*).

Жирные кислоты проявляют свойства разобщителей окислительного фосфорилирования. Эндогенные разобщители действуют как регуляторы термогенеза. Именно этот механизм позволяет животным и человеку выживать в условиях низких температур и переживать зиму в условиях гибернации [13]. С другой стороны, известно, что разобщители способны увеличивать продолжительность жизни и бороться с распространенными патологиями [14].

Существуют только два варианта производства энергии в клетках человека: гликолиз и окислительное фосфорилирование. Соотношение этих процессов по-разному меняется в разных клетках в зависимости от энергетических потребностей и не только. В процессе гликолиза в клетках накапливается лактат. Отношение к лактату за последние годы претерпело существенный поворот. Если в течение примерно 100 лет его считали побочным бросовым продуктом, то теперь рассматривают теории о том, что лактат, возможно, является ключевым редокс-регулятором метаболизма [15]. В 2020 году опубликована статья, в которой лактат назван "гадким утенком" энергетического метаболизма [16]. Действительно, недавно показали, что подавление цепи переноса электронов и соответствующее увеличение продукции лактата стимулирует стволовые клетки волос и запускает цикл роста волоса [17–19].

Целью нашей работы было всестороннее изучение действия длинноцепочечных СЖК на разные типы клеток в культуре при стандартных условиях.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки. В работе использовали следующие клеточные культуры: 977 — штамм эмбриональных фибробластов человека (получен от С.М. Терехова, МГНЦ РАМН); 977 hTERT – эмбриональные фибробласты, экспрессирующие белковый компонент теломеразы (получены самостоятельно); 1608 hTERT – линия фибробластов кожи взрослого человека, иммортализованных введением гена белкового компонента теломеразы человека (исходные штамм получен от С.М. Терехова, иммортализация проведена нами [20]); ІС-21 – перевиваемая культура макрофагов мыши; Caki-1 культура, полученная из светлоклеточного рака почки человека (сохраняет ряд характеристик первичной культуры); НерG2 – культура гепатоклеточной карциномы человека (сохраняет ряд характеристик гепатоцитов); SK-N-SH - культура нейробластомы человека; L6 – культура скелетных миобластов крысы; HaCat – иммортализованные кератиноциты человека.

Клетки (кроме IC-21) культивировали при 37°С в атмосфере 5% углекислого газа в среде DMEM ("ПанЭко", Россия) с содержанием глюкозы 4.5 г/л и добавлением глутамина, гентамицина (40 мкг/мл) и 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Клетки IC-21 культивировали в среде RPMI-1640 с теми же добавками.

Опыты по изучению действия СЖК проводили в полной среде с сывороткой.

Реактивы. Определяли влияние длинноцепочечных СЖК на различные параметры жизнедеятельности клеток в культуре. В анализе использовали следующие жирные кислоты:

1. Пальмитиновая кислота, насыщенная C16:0, ("Sigma-Aldrich" Р0500, США);

2. Олеиновая кислота, C18:1, *цис*, омега 9 ("Sigma-Aldrich" O1630);

3. Линоленовая кислота, C18:3, омега 3, цис, цис, цис 9,12,15 ("Sigma-Aldrich" L2376);

4. Линолевая кислота, C18:2 омега 6, *цис*, *цис* 9,12 ("Sigma-Aldrich" L8134);

5. Конъюгированная линолевая кислота C18:2, смесь изомеров *цис* и *транс* 9,11 и 10,12. ("Sigma-Aldrich" O5507);

6. Элаидиновая кислота (*транс*-изомер олеиновой кислоты) ("Sigma-Aldrich" E4637);

7. Смесь перечисленных жирных кислот.

Для перевода СЖК в раствор готовили комплексы СЖК с сывороточным альбумином: смешивали горячий спиртовой раствор жирных кислот с теплым (37°С) раствором бычьего сывороточного альбумина (7–10%). После этого pH раствора доводили до 7.2–7.4 с помощью 10% гидроксида натрия. Раствор фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.2 мкм, делили на аликвоты и хранили при –20°С.

Лактат определяли с использованием набора Lactate-Glo<sup>™</sup> Assay ("Promega", США) согласно рекомендациям производителя. Добавленная лактатдегидрогеназа реагирует с лактатом с образованием NADH. В присутствии NADH специальная редуктаза превращает пролюциферин в люциферин, который выявляют с помощью люциферазы. Измерения проводили через 2 дня после добавления СЖК.

Уровень глюкозы в среде определяли с помощью тест-полосок OneTouch Select Plus через 2 дня после добавления СЖК. При расчетах разницу между начальной и конечной концентраций глюкозы нормировали на количество клеток.

Потребление кислорода определяли с использованием набора ab197243 Extracellular O2 Consumption Reagent ("AbCAM", Великобритания). Применяли методику, указанную производителем. К живым клеткам добавляли чувствительный к кислороду флуоресцентный краситель, диффузию кислорода из воздуха блокировали специальным (из набора) минеральным маслом. Кислород вызывает тушение флуоресценции красителя, уменьшая время жизни возбужденного состояния, которое измеряли, используя планшетный мультимодальный ридер Spark ("Tecan", Швейцария), согласно рекомендациям производителя.

Жировые включения выявляли в клетках, фиксированных 4%-ным формальдегидом и окрашенных насыщенным раствором красителя Sudan 4. Морфологию клеток определяли с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Diaphot ("Nikon", Япония) и фотоаппарата Nikon D5000.

Состояние лизосом оценивали с помощью прижизненной микроскопии клеток, окрашенных акридиновым оранжевым (1 мкг/мл) непосредственно в ростовой среде [21]. Фотографировали с помощью микроскопа Olympus BX53.

Активацию лизосом определяли с использованием проточного цитофлуориметра BD LSR-Fortessa. СЖК добавляли за сутки до измерения. Клетки снимали трипсином. Суспензию клеток (5 × 10<sup>5</sup> клеток/мл) окрашивали акридиновым оранжевым в течение 15 мин. Зеленую и красную флуоресценцию регистрировали в каналах FITC и PE-Cy5-5 соответственно.

Транскриптомный анализ проводили с использованием прибора HiSeq 2000 ("Illumina", США), как описано ранее [22]. Смесь СЖК (суммарная концентрация 500 мкМ) добавляли к клеткам 1608hTERT за 24 ч до эксперимента.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Первичный анализ эффектов СЖК

Токсичные концентрации СЖК были определены в предварительных экспериментах. С этой целью к растущим клеткам однократно добавляли СЖК в разных концентрациях. В концентрации 500 мкМ все использованные СЖК в разной степени угнетали рост клеток. При этом конъюгированная линолевая кислота оказывала цитотоксическое действие на клетки IC-21 и на HepG2, вызывая их гибель уже через 2 дня. Кератиноциты HaCat оказались наиболее, а макрофаги IC-21 – наименее устойчивыми к СЖК клет-ками.

Действие СЖК приводило к специфическим изменениям морфологии клеток. В цитоплазме появлялись и росли гранулы, расположенные вокруг ядра (рис. 1*г*). Витальное окрашивание акридиновым оранжевым показало, что основой этого гранулярного материала являются лизосомы (рис. 1 $\sigma$ , e, e, n, m). Также образуются в разной степени выраженные липидные пузырьки, которые при окрашивании акридиновым оранжевым выглядят черными (рис. 1e).

Комбинируя различные СЖК, мы получили смесь, отдаленно напоминающую смесь жирных кислот в плазме крови человека [23], которая сравнительно мало токсична для всех исследованных клеток. Эта смесь состоит из 65% олеиновой, 22% линолевой, 10% пальмитиновой и 3% линоленовой кислот и в концентрации 250 мкМ (суммарная концентрация СЖК) не вызывает угнетения роста всех исследованных клеток. В концентрации 500 мкМ смесь СЖК вызывает подавление пролиферации (однократное введение, длительность эксперимента 3 дня).

Степень активации лизосом и образования липидных включений были разными в разных клетках и при действии различных СЖК. Активацию лизосом (первый этап аутофагии) наблюдали, начиная с концентрации СЖК 125 мкМ. С помощью проточной цитометрии с прижизненной окраской акридиновым оранжевым проведено количественное исследование активации лизосом в клетках 1608hTERT (рис. 2). Известно, что соотношение красного и зеленого сигналов акридинового оранжевого отражает уровень аутофагии, определенный в других тестах [21].



**Рис. 1.** Видимые эффекты добавления СЖК к клеткам.  $a, \delta, e, e -$ клетки 977;  $\partial, e, \kappa -$ клетки L6; w, s, u -клетки HepG2; n, m -клетки HaCat.  $a, \delta, \partial, w -$ Контроли. e -Добавление линоленовой кислоты. Видно, что вокруг ядер клеток собрался какой-то гранулярный материал, сильно преломляющий свет. Видна митотическая клетка. e -Гранулярный материал, сильно преломляющий свет. Видна митотическая клетка. e -Гранулярный материал, сильно преломляющий свет. Видна митотическая клетка. e -Гранулярный материал, сильно преломляющий свет. Видна митотическая клетка. e -Гранулярный материал представлен активированными лизосомами (красные) и гидрофобными вакуолями (черные, показаны белыми стрелками), куда не входит акридиновый оранжевый. e -Хорошо заметна активация лизосом (красные). s -Клетки HepG2 после воздействия элаидиновой кислоты. Видны крупные круглые вакуоли. u -Окраска Суданом 4 выявляет липидные включения.  $\kappa -$ Клетки L6 в присутствии конъюгированной линолевой кислоты, видны липидные включения; n - HaCat в присутствии пальмитиповой кислоты; w - HaCat в присутствии конъюгированной линолевой кислоты. Видны отрезок 100 мкм ( $a, e, w, s, u, \kappa$ ); 10 мкм ( $\delta, e, d, e, n, m$ ).

#### ВЛИЯНИЕ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ



**Рис. 2.** Исследование активации лизосом с помощью акридинового оранжевого в клетках 1608hTERT. СЖК (по 500 мкМ) добавляли к клеткам за 24 ч до опыта. Приведены распределения сигналов зеленой и красной флуоресценции, а также бокового рассеяния (мера гранулярности объекта). На всех гистограммах по оси абсцисс показана интенсивность флуоресценции, а по оси ординат – количество событий (клеток). Сигналы от контрольных клеток приняты за 100%. Counts – число событий. Red/Green – соотношение средних сигналов по красному и зеленому каналам – отражает уровень аутофагии.

Наименьшую активацию вызывали олеиновая кислота и смесь на базе олеиновой (1.10 и 1.11 соответственно). Наибольшую активацию вызвала элаидиновая кислота (2.22). Однако этот результат свидетельствует скорее о токсическом действии элаидиновой кислоты, поскольку снизилась интенсивность сигналов клетки по зеленому каналу, что может быть связано с потерей мембранами барьерной функции. Также сигнал по красному каналу необычайно расширился, что указывает на рост гетерогенности клеток. Вероят-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

но, мы зафиксировали промежуточный вариант начала гибели клеток под влиянием элаидиновой кислоты (*mpahc*-изомера олеиновой).

Из оставшихся вариантов наибольшую активность проявили линоленовая (1.52) и линолевая (1.50) кислоты. Пальмитиновая (1.39) и конъюгированная линолевая (1.37) оказались промежуточными.

Увеличение сигналов бокового рассеяния означает увеличение преломляющих поверхностей в клетках, т.е. образование и рост вакуолей (лизосом и липидных включений). Маленькое боковое рассеяние при действии конъюгированной линолевой кислоты (как в контроле) может отражать тот факт, что при действии конъюгированной линолевой кислоты клетки сжимаются, а лизосомы располагаются плотным комком, как показано на рис. 1*м*. Собирание лизосом в один комок обычно отражает токсическое действие, которое завершается гибелью клеток.

Вторым (помимо лизосом) заметным морфологическим проявлением действия СЖК стало появление липидных включений (табл. 1) (рис. 1e, s, u,  $\kappa$ ). Прежде всего стоит отметить, что пальмитат (единственная насыщенная СЖК в исследовании) способствует образованию липидных включений в меньшей степени, чем другие СЖК. Клетки, обработанные пальмитатом, претерпевают незначительные морфологические изменения и сходны с контрольными клетками (рис. 1n).

Образование липидных включений очень сильно зависит от типа клеток. Сильнее всего этот процесс выражен в клетках печени (табл. 1) (рис.  $1_3$ , u). Липидные включения становились большими, круглыми и захватывали существенный объем цитоплазмы. Другие клетки, прежде всего клетки почек, мышечные и нервные, также образовывали значительные липидные накопления, но их размер был меньше (рис.  $1\kappa$ ). Наименьшей способностью накапливать липидные включения обладали эпителиальные клетки эпидермиса HaCat.

Ненасыщенные СЖК (олеиновая, линолевая и линоленовая) способствовали формированию жировых включений в большей степени, действие смеси СЖК напоминало действие олеиновой кислоты (СЖК, наиболее представленная в смеси), конъюгированная линолевая кислота была явно слабее. Олеиновая и элаидиновая СЖК (цис- и *транс*-изомеры) действовали примерно одинаково (табл. 1).

#### Оценка гликолиза

При изучении действия СЖК нас интересовали изменения метаболизма, прежде всего гликолиза. В процессе гликолиза образуется пируват, который в дальнейшем либо восстанавливается до лактата (когда клетки усиленно нуждаются в гликолизе, часто при недостатке кислорода), либо пируват окисляется митохондриями [24, 25]. Образовавшийся лактат выделяется в среду, что ведет к ее закислению. Иногда гликолиз оценивают по внеклеточному закислению, например набор ab197244 Glycolysis Assay.

Мы наблюдали изменения pH, происходящие при росте клеток, по изменению цвета среды (рис. 3). Видно, что наибольшее закисление происходит в среде с пальмитатом (лунки под номером 3). Все остальные СЖК и их смеси вызывают примерно одинаковый более слабый эффект закисления.

Аналогичные изменения происходили при добавлении различных СЖК и их смесей к различным клеткам. Более сильный эффект закисления наблюдали в быстрорастущих клетках (HepG2, SK-N-SH и L6), менее заметный — в первичных фибробластах и макрофагах. При более плотной посадке клеток (когда они образовывали монослой и меньше делились) закисление среды уменьшалось.

Эффект закисления среды коррелировал с накоплением лактата (табл. 2) и потреблением глюкозы.

Мы не наблюдали накопления лактата клетками HepG2, видимо, из-за особенностей метаболизма клеток печени, в которых образующийся лактат превращается в пируват (цикл Кори).

Уровень глюкозы в среде анализировали с помощью тест-полосок OneTouch Select Plus при исходной концентрации глюкозы 1 и 4.5 г/л. Во всех

Клетки	Пальми- тиновая кислота	Олеиновая кислота	Лино- левая кислота	Линоленовая кислота	Конъюги- рованная линолевая кислота	Элаидиновая кислота	Смесь СЖК
IC-21	0	++	++	++	++	++	++
HaCat	+	++	++	+	+	++	++
L6	+	++	++	+	+	++	++
SK-N-SH	+	++	++	+++	++	++	++
977hTERT	+	++	+++	++	+	++	+
Caki-1	+	+++	+++	+++	+	+++	++
HepG2	++	++++	++++	*	++**	++++	++++

**Таблица 1.** Накопление жировых включений в клетках, обработанных СЖК в концентрации 500 мкМ, в течение 3 дней

\* Токсическое действие, гибель клеток.

\*\* Признаки токсического действия, торможение роста.



**Рис. 3.** Влияние СЖК на pH среды культивирования. В среду для культивирования клеток HaCat (нижний ряд), клеток 1608hTERT (средний ряд) и клеток IC-21 (верхний ряд) добавлен краситель (феноловый красный), цвет которого меняется при изменениях pH. При закислении среда желтеет, при защелачивании становится малиновой. В лунки 3–11 добавлены различные жирные кислоты и их смеси. Клетки росли 2 дня. В итоге все эти лунки более желтые. Стоит отметить, что непосредственно после добавления жирных кислот цвет всех лунок был одинаковым. 1 – разобщитель Ват-15, 2 – контроль, 3 – пальмитат, 4 – олеат, 5 – линоленовая кислота, 6 – линолевая кислота, 7 – конъюгированная линолевая кислота, 8 – смесь СВЖ, 9 – элаидиновая кислота, 10 и 11 – смеси СЖК, 12 – лунки без клеток.

случаях в присутствии СЖК клетки потребляли больше глюкозы, чем без СЖК (табл. 3, рис. 4).

Таким образом, в присутствии СЖК клетки сильнее закисляют среду, выделяют больше лактата и потребляют больше глюкозы, что означает стимуляцию гликолиза СЖК.

#### Изменения потребления кислорода клетками

Известно, что СЖК вызывают разобщение окислительного фосфорилирования в клетках, что сопровождается усилением потребления кислорода. Мы решили в этом убедиться, измерив потребление кислорода на целых клетках в полной среде культивирования. Действительно, СЖК вызывали усиление дыхания (рис. 5). Наибольшей способностью стимулировать дыхание практически во всех исследованных клетках обладала пальмитиновая кислота. Ее эффект был сопоставим с действием разобщителя Bam-15 (10 мкМ) (рис. 5*в*) [26].

Конъюгированная линолевая кислота оказывала самое слабое разобщающее действие; в ряде случаев (совпадающих с цитотоксическим действием) можно было заключить, что она подавляет дыхание (рис. 5a,  $\delta$ ).

Олеиновая кислота оказывала слабый эффект. Наблюдали также промежуточные эффекты: других СЖК, разные в разных клетках (рис. 5*в*). В ряде опытов отдельные СЖК не стимулировали дыхания.

Свободная жирная кислота	977	IC-21	HepG2	HaCat	L6	SK-N-SH
Контроль	100	100	100	100	100	100
Пальмитат	106	105	87	112	109	111
Линоленовая	106	106	96	108	106	109
Линолевая	107	105	97	106	108	107
Олеиновая	105	103	94	106	107	108
Конъюгированная	100	99*	70*	104	102	102
Элаидиновая	104	105	96	105	107	106

Таблица 2. Накопление лактата (%) при действии свободных жирных кислот (500 мкМ)

\*Наблюдали токсическое действие.



Рис. 4. Потребление глюкозы клетками в присутствии смеси СЖК.

Таким образом, показано, что большинство СЖК стимулируют потребление кислорода клетками.

#### Транскриптомный анализ

Проведено полнотранскриптомное исследование действия смеси СЖК на клетки 1608hTERT. Компьютерная обработка результатов выявила ряд процессов (клеточное деление, развитие, изменение обмена липидов), в которых участвует множество дифференциально экспрессируемых генов, однако не позволила оценить изменение интенсивности определенных процессов метаболизма. В то же время, ручная обработка результатов позволила составить следующую таблицу (табл. 4).

Из табл. 4 следует, что экспрессия всех ключевых генов гликолиза увеличилась примерно в 1.5 раза. Активность гена разобщающего белка 2 (UCP2) возросла на порядок. Учитывая короткое время жизни UCP2 (около 30 мин) [27], можно считать, что экспрессия этого белка, ведущая к разобщению, возрастает в ответ на СЖК. Известно, что разобщители, в том числе СЖК, увеличивают экспрессию UCP2 [28].

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прежде всего мы хотим отметить, что в отличие от многих ученых, изучавших действие жирных кислот на различные клетки, мы не наблюдали особенно выраженного токсического действия пальмитата.

Липотоксичность пальмитата много раз показана на гепатоцитах [29, 30], миобластах [31–34], бета-клетках поджелудочной железы [35], клетках почки [36]. При изучении токсического действия пальмитата в момент его добавления использовали либо 1%-ную сыворотку, либо раствор альбумина (2–5%) [11, 29–38].

В наших опытах, наоборот, токсичность пальмитата была наименьшей из всех изученных СЖК. Это связано с проведением опытов в условиях, приближенных к условиям *in vivo*, в которых всегда присутствует смесь СЖК. Мы культивировали клетки в полной стандартной среде, а именно в среде с добавлением 10% сыворотки крови.

Известно, что сыворотка практически всегда улучшает выживаемость клеток. Механизмы протективного действия сыворотки могут быть различными: ингибирование протеаз, присутствие разнообразных факторов роста, снижение проницаемости плазмалеммы и т.д. Именно поэтому другие авторы все-таки используют хотя бы 1% сыворотки. Вероятно, в нашем случае происходило разбавление пальмитата другими СЖК из сыворотки. Известно, что пальмитат очень легко входит в состав жирных кислот фосфолипидов и его концентрация достигает больших величин (например, 43% от всех жирных кислот в составе фосфолипидов [29]).

Легко предположить, что фосфолипид, имеющий два остатка пальмитата, крайне необычен для мембран, он изменяет их кривизну и таким спосо-

**Таблица 3.** Потребление глюкозы фибробластами 977 в присутствии различных свободных жирных кислот (500 мкМ)

Свободная жирная кислота	Глюкоза, мМ	Снижение концентрации глюкозы, мМ	Удельное потребление глюкозы, %
Контроль	27.8	0.4	100
Пальмитиновая	27.3	0.9	241
Олеиновая	27.5	0.7	192
Линолевая	27.8	0.4	114
Линоленовая	27.1	1.1	322
Конъюгированная линолевая	27.7	0.5	170



**Рис. 5.** Потребление кислорода клетками при добавлении СЖК. *а* – Исходные кривые изменения времени жизни возбужденного состояния красителя, зависимого от кислорода. Начальный этап характеризуется диффузией кислорода из минерального масла. После установления равновесия кривая отражает скорость дыхания. *б* – Способ оценки скорости дыхания. В качестве меры дыхания выбран коэффициент при аргументе функции после проведения соответствующего тренда. *в* – Скорость дыхания. Указаны отдельные СЖК: *bam* – Ват-15, *lino* – линолевая, *palm* – пальмитиновая, *mix* – смесь, *lilen* – линоленовая, *ole* – олеиновая, *conj* – конъюгированная линолевая кислота. Статистическая обработка проведена по сумме СЖК.

бом нарушает барьерные функции мембран, что ведет к фатальным последствиям [33].

"Разбавление" насыщенного пальмитата ненасыщенными жирными кислотами нормализует свойства образованных фосфолипидов и резко снижает токсичность. Известно, что олеат "спасает" мышечные клетки от токсического действия пальмитата [32, 33].

Наши расчеты показывают, что концентрация СЖК в сыворотке определяется жирными кислотами, связанными с альбумином, и не превышает 50 мкМ (в 10 раз меньше используемой нами). В опытах без сыворотки или с 1% сыворотки мы наблюдали выраженное токсическое действие пальмитата (данные не приведены). Мы полагаем, что известная токсичность пальмитата проявляется только в опытах, проведенных в отсутствие других жирных кислот, и поэтому является своего рода артефактом, поскольку не встречается *in vivo*.

Если один из двух источников "энергоснабжения" клеток уменьшается (в результате разобщения окислительного фосфорилирования), то альтернативный источник (гликолиз) должен расти, чтобы поддержать нормальный уровень энергопотребления. Именно так и происходит в наших опытах. Аналогичные результаты получены совсем недавно при разобщении с помощью Ват-15 [26]. Известно, что увеличенная экспрессия UCP2 (по сути, разобщение) стимулирует гликолитические ферменты и усиливает гликолиз [39]. При дифференцировке и созревании иммунных клеток происходят закономерные перестройки метаболизма между гликолитическим и окислительным [40, 41].

Поведение клеток в наших опытах можно рассматривать как попытку сохранить свой гомеостаз при действии токсических факторов внешней среды. СЖК, добавленные к клеткам в большом избытке, отсоединяются от своего внеклеточного переносчика (альбумина) и попадают внутрь клеток. В какой-то момент в клетках возникает недостаток внутриклеточных переносчиков СЖК. СЖК начинают растворяться в мембранах и менять их свойства (действие СЖК как антибиотиков), образовывать агломераты [3].

В случае пальмитата СЖК начинает интенсивно входить в состав фосфолипидов [29], что также меняет свойства мембран. Для поддержания жизнеспособности клетке надо избавляться от избытка СЖК.

1. Один из вариантов – это "сжечь" СЖК через бета-окисление, последующее прохождение цикла Кребса и дыхательную цепь. Однако в условиях частичного разобщения бета-окисление неспособно привести к увеличению продукции АТР, поскольку такая прибавка должна происходить также в результате окислительного фосфорилирования. Единственная возможность поддержать сократившийся уровень АТР – это продукция АТР, не связанная с дыхательной цепью митохондрий, т.е. гликолиз.

Хорошо известный пример стимуляции гликолиза — это ограничение доступности кислорода. Хотя при окислении жирных кислот можно получить больше АТР, чем при окислении глюкозы (на одинаковый вес субстрата), однако затраты кислорода на получение единицы АТР при бета-окислении выше за счет большего соотношения образующихся FADH<sub>2</sub>/NADH. Глюкоза дает 5.19 ккал/л кислорода, жирные кислоты 4.81 ккал/л кислорода [42]. Известно, что при увеличении физической нагрузки, когда возрастает потребность в АТР, метаболизм спортсменов переключается с сжигания липидов на сжигание углеводов.

Имеет ли ограничение доступности кислорода отношение к нашему случаю выращивания клеток в условиях атмосферного кислорода? Возможно имеет.

Клеточные биологи обычно рассуждают следующим образом. Поскольку концентрация кислорода в воздухе всегда выше, чем в организме, то клетки в термостате с атмосферным воздухом сталкиваются с избытком, но никак не с недостатком кислорода [43]. Однако благодаря низкой растворимости кислорода в среде и, главным образом, высокому диффузионному барьеру (слою среды толщиной в несколько мм) скорость потребления кислорода клетками на дне культурального флакона может превышать скорость его поступления [44]. Можно полагать, что в наших условиях (с учетом повышенного дыхания за счет разобщения) клетки могли находиться в условиях ограничения по кислороду, следовательно, переход энергетического метаболизма в сторону гликолиза закономерен.

2. Другой вариант защиты от избытка СЖК – это упаковка СЖК в триглицериды для дальнейшего хранения. Если в клетке экспрессируются соответствующие гены, то этот вариант предпо-

Процесс	Ген	Изменение количества транскриптов	Генный продукт	Функции продукта	
Гликолиз	HK1	$5560 \rightarrow 8550$	Гексокиназа	Первая реакция гликолиза	
	PFKP	$2982 \rightarrow 5496$	Dechedpyrroruuszu		
	PFKL	$3818 \rightarrow 5953$	Фосфофруктокиназы	Ключевая стадия Пликолиза	
	РКМ2	$62733 \rightarrow 125288$	Пируваткиназа	Образование АТР и пирувата	
	LDHA	$41399 \rightarrow 53613$		Взаимопревращения лактата и	
	LDHB	$4181 \rightarrow 5771$	лактандегидрогеназы	пирувата	
Разобщение	UCP1	$0 \rightarrow 0$		Разобщение окислительного фосфорилирования	
	UCP2	$26 \rightarrow 227$	Разобщающие белки		
	UCP3	$32 \rightarrow 18$			

Таблица 4. Изменения транскрипции ключевых генов гликолиза и разобщения в клетках 1608hTERT при добавлении смеси свободных жирных кислот

чтителен [45]. В наших экспериментах все клетки аккумулировали (но в разной степени) липиды в виде липидных пузырьков — наиболее существенно клетки печени, далее клетки почки и мышц. Эпидермальные клетки и фибробласты делали это в меньшей степени.

3. В ответ на добавление СЖК в клетках увеличивается экспрессия UCP2 (и по нашим, и по опубликованным данным) [46–48]. Включается механизм разобщения, усиливается дыхание и происходит усиленное сжигание любого доступного субстрата, включая и конечные продукты бета-окисления жирных кислот, снижая тем самым концентрацию СЖК. Предполагается, что этот механизм работает в адипоцитах и предотвращает попадание СЖК в свободную циркуляцию [49].

4. Утилизация СЖК через аутофагию. Мы не нашли экспериментальных подтверждений прямой утилизации СЖК посредством аутофагии. Известно, что при липофагии (частный вариант аутофагии) деградации подвергается материал липидных пузырьков, но не СЖК [50]. При этом не происходит слияния лизосом с липидными пузырьками. Сначала на основе липидного пузырька формируется аутофагосома и лишь затем происходит слияние с лизосомой [51]. При этом СЖК прямо расходуются в процессе роста фагофоров. Синтез фосфолипидов происходит *in situ* [52].

Мы можем предположить, что благодаря низкой растворимости часть СЖК начинает взаимодействовать друг с другом, образуя надмолекулярные комплексы, напоминающие мицеллы [3], которые уже не могут вступать в свойственные СЖК реакции. Такие комплексы, вероятно, распознаются клеткой как мусор и поступают в лизосомы

Переключение энергетического метаболизма с митохондриального на гликолитический и обратно имеет место в процессах развития. Поэтому искусственное влияние на этот процесс (метаболическое репрограммирование) может иметь значение в терапии определенных расстройств. Например, воздействие разобщителей перестраивает метаболизм, что может положительно влиять на продолжительность жизни и течение многих патологий [14, 26].

В последние годы становится совершенно очевидным, что перестройка метаболизма с окислительного на гликолитический работает как регулятор дифференцировки клеток иммунной системы [53–55].

Классические активированные макрофаги (типа M1) имеют гликолитический метаболизм. Они нацелены против микробов и поддерживают воспаление. Метаболизм альтернативных, или регуляторных, макрофагов (M2) основан на митохондриальном окислении. Эти макрофаги наблюдают в микроокружении опухолей, они снижают воспаление [56].

Известно, что опухоли создают вокруг себя иммуносупрессивное окружение. Возможно, что основой этого является локально усиленная продукция лактата, который тормозит гликолиз и перепрограммирует макрофаги в регуляторный тип M2 [57, 58]. Многократно описаны антивоспалительные эффекты лактата [58–61] и даже регенерирующий ангиогенный эффект [62]. Возможно, что в регуляции лактатом участвуют эпигенетические механизмы [63–65].

Медицинское применение СЖК можно представить следующим образом. СЖК наносят (вводят) локально, после чего клетки, получившие СЖК, на длительное время становятся источником лактата. В результате локальное воспаление снижается, а привлеченные макрофаги оказывают регулирующий (регенеративный) эффект, пытаясь ликвидировать в организме область "гипоксии" (появление лактата признак гипоксии), способствуя ангиогенезу. В отличие от применения разобщителей, действие СЖК позволяет разлелить клетки на две категории: клетки, в которых произошел длительный гликолитический сдвиг (клетки пытаются избавиться от избытка СЖК с помощью разобщения), и клетки (мигрирующие клетки иммунной системы), которые, реагируя на продукцию лактата, снижают уровень воспаления. При действии низкомолекулярных разобщителей, гликолитический сдвиг может оказывать провоспалительное действие, поскольку будет применим к большинству клеток организма.

Вопрос о терапевтическом применении СЖК необычайно сложен, поскольку многократно описаны токсические эффекты СЖК [66, 67]. Повышенная концентрация СЖК в плазме крови рассматривается как плохой прогностический признак, сопровождающий ожирение, сахарный диабет второго типа и атеросклероз. Проблема нуждается в дополнительных исследованиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-04-01071.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Yoon B.K., Jackman J.A., Valle-González E.R., Cho N.-J. (2018) Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1114. https://doi.org/10.3390/ijms19041114

- 2. Ruffell S.E., Müller K.M., McConkey B.J. (2016) Comparative assessment of microalgal fatty acids as topical antibiotics. J. Appl. Phycol. 28, 1695-1704.
- 3. Desbois A.P., Smith. V.J. (2010) Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, 1629-1642. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3
- 4. Fischer C.L. (2020) Antimicrobial activity of host-derived lipids. Antibiotics. 9, 75. https://doi.org/10.3390/antibiotics/9020075
- 5. Viktorova E.G., Nchoutmboube J.A., Ford-Siltz L.A., Iverson E., Belov G.A. (2018) Phospholipid synthesis fueled by lipid droplets drives the structural development of poliovirus replication organelles. PLoS Pathol. 14, e1007280.

https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007280

- 6. Carrasco S., Mérida I. (2006) Diacvlglycerol, when simplicity becomes complex. Trends Biochem. Sci. 32, 27-36. https://doi.org/10.1016/j.tibs.11.004
- 7. Nakamura M.T., Yudel B.E., Loor J.J. (2014) Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. Progress Lipid Res. 53, 124-144.
- 8. Lancaster G.I., Langley K.G., Berglund N.A., Kam-moun H.L., Reibe S., Estevez E., Weir J., Mellett N.A., Pernes G., Conway J.R.W., Lee M.K.S., Timpson P., Murphy A.J., Masters S.L., Gerondakis S., Bartonicek N., Kaczorowski D.C., Dinger M.E., Meikle P.J., Bond P.J., Febbraio M.A. (2018) Evidence that TLR4 is not a receptor for saturated fatty acids but mediates lipid-induced inflammation by reprogramming macrophage metabolism. Cell Metabolism. 27, 1096-1110. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.014
- 9. Serhan C.N., Levy B.D. (2018) Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. J. Clin. Invest. 128. 2657-2669. https://doi.org/10.1172/JCI97943
- 10. Plötz T., Krümmel B., Laporte A., Pingitore A., Persaud S.J., Jörns A., Elsner M., Mehmeti I., Lenzen S. (2017) The monounsaturated fatty acid oleate is the major physiological toxic free fatty acid for human beta cells. Nutrition Diabetes. 7, 305. https://doi.org/10.1038/s41387-017-0005-x
- 11. Tumova J., Malisova L., Andel M., Trnka J. (2015) Protective effect of unsaturated fatty acids on palmitic acid-induced toxicity in skeletal muscle cells is not mediated by PPARδ activation. *Lipids*. **50**, 955–964. https://doi.org/10.1007/s11745-015-4058-0
- 12. Patková J., Anděl M., Trnka J. (2014) Palmitate-induced cell death and mitochondrial respiratory dysfunction in myoblasts are not prevented by mitochondria-targeted antioxidants. Cell Physiol. Biochem. 33, 1439. https://doi.org/10.1159/000358709
- 13. Chouchani E.T., Kazak L., Jedrychowski M.P., Lu G.Z., Erickson B.K., Szpyt J., Pierce K.A., Laznik-Bogoslavski D., Vetrivelan R., Clish C.B., Robinson A.J., Gygi S.P., Spiegelman B.M. (2016) Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1. Nat. 532, 112-116.
- 14. Егоров Е.Е. (2020) Здоровое старение: антиоксиданты, разобщители и/или теломераза? Молекуляр. биология. 54(3), 355-361. https://doi.org/10.31857/S0026898420030052
- 15. Brooks G.A. (2020) Lactate as a fulcrum of metabolism. Redox Biol. 35, 101454.

- 16. Rabinowitz J.D., Enerbäck S. (2020) Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. Nat. Metab. 2, 566-571. https://doi.org/10.1038/s42255-020-0243-4
- 17. Flores A., Schell J., Krall A., Jelinek D., Miranda M., Grigorian M., Braas D., White A. C., Zhou J., Graham N., Graeber T., Seth P., Evseenko D., Coller H., Rutter J., Christofk H., Lowry W. (2017) Lactate dehydrogenase activity drives hair follicle stem cell activation. Nat. Cell Biol. 19, 1017-1026. https://doi.org/10.1038/ncb3575
- 18. Miranda M., Christofk H., Jones D.L., Lowry W.E. (2018) Topical inhibition of the electron transport chain can stimulate the hair cycle. J. Invest. Dermatol. 138, 968e972.

https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.10.021

- 19. Son M.J., Jeong J.K., Kwon Y., Ryu J.S, Mun S.J., Kim H.J., Kim S.W., Yoo S., Kook J., Lee H., Kim J., Chung K.S. (2018) A novel and safe small molecule enhances hair follicle regeneration by facilitating metabolic reprogramming. Exper. Mol. Med. 50, 1–15. https://doi.org/10.1038/s12276-018-0185-z
- 20. Егоров Е.Е., Терехов С.М., Вишнякова Х.С., Караченцев Д.Н., Казимирчук Е.В., Цветкова Т.Г., Вейко Н.Н., Смирнова Т.Д., Макаренков А.С., Эльдаров М.А., Мещерякова Ю.А., Ляпунова Н.А., Зеленин А.В. (2003) Теломеризация - способ получения иммортальных клеток человека, сохраняющих нормальные свойства. Онтогенез. 34, 183-192.
- 21. Thomé M.P., Filippi-Chiela E.C., Villodre E.S., Mi-gliavaca C.B., Onzi G.R., Felipe K. B., Lenz G. (2016) Ratiometric analysis of acridine orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. J. Cell Sci. 129, 4622-4632.

https://doi.org/10.1242/jcs.195057

- 22. Вишнякова Х.С., Бабижаев М.А., Алипер А.М., Буздин А.А., Кудрявцева А.В., Егоров Е.Е. (2014) Стимуляция пролиферации карнозином: клеточный и транскриптомный подход. Молекуляр. биология. 48, 824-833.
- 23. Miwa H. (2002) High-performance liquid chromatographic determination of free fatty acids and esterified fatty acids in biological materials as their 2-nitro-phenylhydrazides. *Anal. Chim. Acta.* **465**, 237–255.
- 24. Lunt S.Y., Heiden M.G.V. (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27, 441-464. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237
- 25. DeBerardinis R.J., Chandel N.S. (2020) We need to talk about the Warburg effect. Nat. Metab. 2, 127-129. https://doi.org/10.1038/s42255-020-0172-2
- 26. Axelrod C.L., King W.T., Davuluri G., Noland R.C., Hall J., Hull M., Dantas W.S., Zunica E.R., Alexopoulos S.J., Hoehn K.L, Langohr I., Stadler K., Doyle H., Schmidt E., Nieuwoudt S., Fitzgerald K., Pergola K., Fujioka H., Mey J.T., Fealy C., Mulya A., Beyl R., Hoppel C.L., Kirwan J.P. (2020) BAM15-mediated mitochondrial uncoupling protects against obesity and improves glycemic control. EMBO Mol. Med. 12, e12088.

https://doi.org/10.15252/emmm.202012088

Rousseta S., Mozoa J., Dujardinb G., EmreaY., Mass-27. cheleyna S., Ricquiera D., Cassard-Doulcier A.-M. (2007) UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life. FEBS Lett. 581, 479-482.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ 2021 том 55 Nº 4

- 28. Sreedhar A., Zhao Y. (2017) Uncoupling protein 2 and metabolic diseases. Mitochondrion. 34, 135-140.
- 29. Leamy A.K., Egnatchik R.A., Shiota M., Ivanova P.T., Myers D. S., Brown H.A., Young J.D. (2014) En-hanced synthesis of saturated phospholipids is associated with ER stress and lipotoxicity in palmitate treated hepatic cells. J. Lipid Res. 55, 1478-1488.
- 30. Nakamura S., Takamura T., Matsuzawa-Nagata N., Takayama H., Misu H., Noda H., Nabemoto S., Kurita S., Ota T., Ando H., Miyamoto K-I., Kaneko S. (2009) Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. J. Biol. Chem. 284, 14809-14818.
- 31. de Vries J.E., Vork M.M., Roemen T.H.M., de Jong Y.F., Cleutjens J.P.M., van der Vusse G.J., van Bilsen M. (1997) Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. J. Lipid Res. 38, 1384-1394.
- 32. Coll T., Eyre E., Rodriguez-Calvo R., Palomer X., Sanchez R.M., Merlos M., Laguna J.C., Vazquez-Carrera M. (2008) Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. J. Biol. Chem. 283, 11107-11116.
- 33. Henique C., Mansouri A., Fumey G., Lenoir V., Girard J., Bouillaud F., Prip-Buus C., Cohen I. (2010) Increased mitochondrial fatty acid oxidation is sufficient to protect skeletal muscle cells from palmitate-induced apoptosis. J. Biol. Chem. 285, 36818-36827.
- 34. Turpin S.M., Lancaster G.I., Darby I., Febbraio M.A., Watt M.J. (2006) Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 291, E1341-E1350.

https://doi.org/10.1152/ajpendo.00095.2006

35. Eitel K., Staiger H., Brendel M.D., Brandhorst D., Bretzel R.G., Häring H.-U., Kellerer M. (2002) Different role of saturated and unsaturated fatty acids in betacell apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 853-856.

https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02752-3

36. Johnson E.S., Lindblom K.R., Robeson A., Stevens R.D., Ilkayeva O.R., Newgard C.B., Kornbluth S., Andersen J.L. (2013) Metabolomic profiling reveals a role for caspase-2 in lipoapoptosis. J. Biol. Chem. 288, 14463-14475.

https://doi.org/10.1074/jbc.M112.437210

- 37. Alnahdi A., John A., Raza H. (2019) Augmentation of glucotoxicity, oxidative stress, apoptosis and mitochondrial dysfunction in HepG2 cells by palmitic acid. Nutrients. 11, 1979. https://doi.org/10.3390/nu11091979
- 38. Plötz T., Krümmel B., Laporte A., Pingitore A., Persaud S.J., Jörns A., Elsner M., Mehmeti I., Lenzen S. (2017) The monounsaturated fatty acid oleate is the major physiological toxic free fatty acid for human beta cells. Nutrition Diabetes. 7, 305. https://doi.org/10.1038/s41387-017-0005-x
- 39. Sreedhar A., Petruska P., Miriyala S., Panchatcharam M., Zhao Y. (2017). UCP2 overexpression enhanced glycolysis via activation of PFKFB2 during skin cell transformation. Oncotarget. 8, 95504-95515.
- 40. Cunningham C.A., Hoppins S., Fink P.J. (2018) Cutting edge glycolytic metabolism and mitochondrial me-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ <u>№</u> 4 2021 том 55

tabolism are uncoupled in antigen-activated CD8+ recent thymic emigrants. J. Immunol. 201, 1627-1632.

- 41. Jing C., Castro-Dopico T., Richoz N., Tuong Z.K., Ferdinand J.R., Lok L.S.C., Loudon K.W., Banham G.D., Mathews R.J., Cader Z., Fitzpatrick S., Bashant K.R., Kaplan M.J., Kaser A., Johnson R.S., Murphy M.P., Siegel R.M., Clatworthy M.R. (2020) Macrophage metabolic reprogramming presents a therapeutic target in lupus nephritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 117, 15160-15171.
- 42. Leverve X., Batandier C., Fontaine E. (2007) Choosing the right substrate. Rev. Novartis Found. Symp. 280, 108-127.
- 43. Halliwell B. (2003) Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? FEBS Lett. 540, 3-6.
- 44. Place T.L., Domann F.E., Case A.J. (2017) Limitations of oxygen delivery to cells in culture: an underappreciated problem in basic and translational research. Free Rad. Biol. Med. 113, 311-322. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003
- 45. Listenberger L.L. Han X.L., Lewis S.E., Cases S., Farese R.V., Ory D.S., Schaffer J.E. (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100, 3077-3082.
- 46. Murray A.J., Anderson R.E., Watson G.C., Radda G.K., Clarke K. (2004) Uncoupling proteins in human heart. Lancet. 364, 1786-1788.
- 47. Cannon B., Nedergaard J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol. Rev. 84, 277-359. https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003
- 48. Sreedhar A., Zhao Y. (2017) Uncoupling protein 2 and metabolic diseases. Mitochondrion. 34, 135-140. https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.03.005
- 49. Maassen J.A., Romijn J.A., Heine R.J. (2007) Fatty acid-induced mitochondrial uncoupling in adipocytes as a key protective factor against insulin resistance and beta cell dysfunction: a new concept in the pathogenesis of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. Diabetologia. 50, 2036-2041. https://doi.org/10.1007/s00125-007-0776-z
- 50. Singh R., Kaushik S., Wang Y., Xiang Y., Novak I., Komatsu M., Tanaka K., Cuervo A.M., Czaja M.J. (2009) Autophagy regulates lipid metabolism. Nature. 458, 1131-1137. https://doi.org/10.1038/nature07976
- 51. Onal G., Kutlu O., Gozuacik D., Emre S.D. (2017) Lipid droplets in health and disease. Lipids Health Dis. 16, 128. https://doi.org/10.1186/s12944-017-0521-7
- 52. Schüttera M., Graef M. (2020) Localized de novo phospholipid synthesis drives autophagosome biogenesis. Autophagy. 16, 770-771. https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1725379
- 53. Suzuki H., Hisamatsu T., Chiba S., Mori K., Kita-zume M.T., Shimamura K., Nakamoto N., Matsuoka K., Ebinuma H., Naganuma M., Kana T. (2016) Glycolytic pathway affects differentiation of human monocytes to regulatory macrophages. Immunol. Lett. 176, 18–27.
- 54. Kelly B., O'Neill L.A.J. (2015) Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. Cell Res. 25, 771-784. https://doi.org/10.1038/cr.2015.68

- 55. Viola A., Munari F., Sánchez-Rodríguez R., Scolaro T., Castegna A. (2019) The metabolic signature of macrophage responses. *Front. Immunol.* **10**, 1462. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462
- 56. Yu Q., Wang Y., Dong L., He Y., Liu R., Yang Q., Cao Y., Wang Y., Jia A., Bi Y. Liu G. (2020) Regulations of glycolytic activities on macrophages functions in tumor and infectious inflammation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 287.

https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00287

- 57. Colegio O.R., Chu N.Q., Szabo A.L., Chu T., Rhebergen A.M., Jairam V., Cyrus N., Brokowski C.E., Eisenbarth S.C., Phillips G.M., Cline G.W., Phillips A.J., Medzhitov R. (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nat.* **513**, 559–563. https://doi.org/10.1038/nature13490
- Errea A., Cayet D., Marchetti P., Tang C., Kluza J., Offermanns S., Sirard J.C., Rumbo M. (2016). Lactate inhibits the pro-inflammatory response and metabolic reprogramming in murine macrophages in a GPR81independent manner. *PLoS One.* 11, e0163694. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163694
- Hoque R., Farooq A., Ghani A., Gorelick F., Mehal W.Z. (2014) Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology.* 146, 1763–1774.
- Iraporda C., Romanin D.E., Bengoa A.A., Errea A.J., Cayet D., Foligne B., Sirard J.C., Garrote G.L., Abraham A.G., Rumbo M. (2016). Local treatment with lactate prevents intestinal inflammation in the TNBSinduced colitis model. *Front. Immunol.* 7, 651. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00651
- Dietl K., Renner K., Dettmer K., Timischl B., Eberhart K., Dorn C., Hellerbrand C., Kastenberger M., Kunz-Schughart L.A., Oefner P.J., Andreesen R.,

Gottfried E., Kreutz M.P. (2010). Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J. Immunol.* **184**, 1200–1209. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902584

- 62. Zhang J., Muri J., Fitzgerald G., Gorski T., Gianni-Barrera R., Masschelein E., D'Hulst G., Gilardoni P., Turiel G., Fan Z., Wang T., Planque M., Carmeliet P., Pellerin L., Wolfrum C., Fendt S.-M., Banfi A., Stockmann C., Soro-Amaiz I., Kopf M., De Bock K. (2020) Endothelial lactate controls muscle regeneration from ischemia by inducing M2-like macrophage polarization. *Cell Metabolism.* **31**, 1136–1153. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.05.004
- Peng M., Yin N., Chhangawala S., Xu K., Leslie C.S., Li M.O. (2016). Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. *Science*. 354, 481–484. https://doi.org/10.1126/science.aaf6284
- 64. Zhang D., Tang Z., Huang H., Zhou G., Cui C., Weng Y., Liu W., Kim S., Lee S., Perez-Neut M., Ding J., Czyz D., Hu R., Ye Z., He M., Zheng Y.G., Shuman H.A., Dai L., Ren B., Roeder R.G., Becker L., Zhao Y. (2019) Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature.* 574, 575–580.
- 65. Izzo L.T., Wellen K.E. (2019) Lactate links metabolism to genes. *Nature*. **574**, 492–493.
- 66. Freigang S., Ampenberger F., Weiss A., Kanneganti T.D., Iwakura Y., Hersberger M., Kopf M. (2013) Fatty acid– induced mitochondrial uncoupling elicits inflammasome-independent IL-1a and sterile vascular inflammation in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* 14, 1045–1053. https://doi.org/10.1038/ni.2704
- Oh Y.S., Bae G.D., Baek D.J., Park E.Y., Jun H.S. (2018) Fatty acid-induced lipotoxicity in pancreatic beta-cells during development of type 2 diabetes. *Front. Endocrinol.* 9, 384. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00384

## LONG-CHAIN FREE FATTY ACIDS INFLUENCE LIPID ACCUMULATION, LYSOSOMES ACTIVATION AND GLYCOLYTIC SHIFT IN VARIOUS CELLS in vitro

#### Kh. S. Vishnyakova<sup>1</sup>, K. V. Popov<sup>1</sup>, X. Pan<sup>1</sup>, M. V. Jasko<sup>1</sup>, and E. E. Yegorov<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia \*e-mail: yegorov58@gmail.com

Hydrophobic molecules may be toxic when present in excess. When dissolved in membranes, hydrophobic molecules disrupt their functions. Studies of the effects of free fatty acids (FFA) on cultured cells contradict each other. Here we describe effects of FFA on various human cells in culture. Addition of long-chain FFA (oleic, palmitic, linoleic, linolenic, etc.) to cultured cells led to lipid accumulation in hepatocytes and muscle cells, initiation of autophagy, and uncoupling of oxidative phosphorylation. Although treated cells increase their oxygen consumption, metabolic shifts in favor of glycolysis were observed. All these effects were expressed to varying degrees in different cells and with the addition of different FFAs. The mechanisms of these FFA effects are discussed, as well their practical implications.

Keywords: free fatty acids, metabolic reprogramming, cell culture, glycolysis, respiration, uncoupling

УДК 577.175.859

### ВЛИЯНИЕ АДИПОНЕКТИНА НА ПРОДУКЦИЮ АПОЛИПОПРОТЕИНОВ А-1 И Е МАКРОФАГАМИ ЧЕЛОВЕКА

# © 2021 г. Д. А. Танянский<sup>а, \*</sup>, А. С. Трулев<sup>а</sup>, Е. В. Агеева<sup>а</sup>, А. А. Никитин<sup>а</sup>, В. С. Шавва<sup>а</sup>, С. В. Орлов<sup>а, b</sup>

<sup>а</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия <sup>b</sup>Caнкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

> \*e-mail: dmitry.athero@gmail.com Поступила в редакцию 09.12.2020 г. После доработки 15.02.2021 г. Принята к публикации 16.02.2021 г.

Адипонектин – гормон жировой ткани, влияющий на энергетический обмен, метаболизм липопротеинов и модулирующий воспалительные реакции. Однако роль данного адипокина в атерогенезе остается малоизученной. В настоящей работе изучено влияние адипонектина на продукцию аполипопротеинов (апо) A-1 и E макрофагоподобными клетками линии THP-1 двух сроков дифференцировки (3 и 5 дней). Адипонектин (10 мкг/мл) стимулировал экспрессию гена *ароА-1* на уровне мРНК в 5-, но не в 3-дневных макрофагах. При этом уровень мРНК ароЕ в макрофагах под действием адипонектина не изменялся. Адипонектин подавлял экспрессию гена *TNF* в макрофагах и повышал экспрессию гена *IL-10* в 5-дневных макрофагах. Адипонектин не изменял уровни апоА-1 и апоЕ в культуральных средах макрофагов обоих сроков дифференцировки и снижал уровень поверхностного апоА-1 в 5-дневных макрофагах. Инкубация 5-дневных макрофагов с антагонистом ядерного рецептора РРАRа MK-886 либо с агонистом ядерных рецепторов LXR TO-901317 приводила к отмене стимулирующего эффекта адипонектина на экспрессию гена *ароА-1*. Полученные данные свидетельствуют о том, что адипонектин не только влияет на воспалительные свойства макрофагов, но и модулирует продукцию апоА-1 макрофагами, что, вероятно, можно рассматривать как один из механизмов его влияния на атерогенез.

**Ключевые слова:** адипонектин, атеросклероз, макрофаги, аполипопротеин А-1, аполипопротеин Е **DOI:** 10.31857/S0026898421040121

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Адипонектин — секретируемый клетками жировой ткани белок (адипокин), продукция которого снижена у пациентов с ожирением и метаболическим синдромом [1–3]. Концентрация данного адипокина в плазме связана с риском развития атеросклероза, его клиническими проявлениями и осложнениями [4, 5]. Адипонектин замедляет развитие экспериментального атеросклероза у животных, вероятно, как путем воздействия на формирование метаболических факторов риска, так и на процессы в сосудистой стенке [6, 7]. Так, адипонектин повышает чувствительность клеток к инсулину [8–10] и уменьшает концентрацию триглицеридов в плазме [6, 11]. Последнее может быть обусловлено влиянием данного адипокина на метаболизм жирных кислот [6], катаболизм липопротеинов [11], а также на продукцию аполипопротеинов (апо) А-1 и В гепатоцитами [11–13]. По данным *in vivo* и *in vitro* адипонектин подавляет адгезию моноцитов на сосудистом эндотелии [14, 15], модулирует дифференцировку макрофагов (МФ) и продукцию ими цитокинов [16–19], подавляет захват МФ модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [20–22] и усиливает отток из них холестерина [22, 23]. Адипонектин реализует свои эффекты посредством взаимодействия со своими рецепторами типа 1 и 2 (AdipoR1/2), которые далее передают сигнал на киназу AMPK (AMP-активируемая протеинкиназа) и ядерные рецепторы активаторов пролиферации

Сокращения: апо – аполипопротеин; БСА – бычий сывороточный альбумин; ИФА – иммуноферментный анализ; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; МФ – макрофаги; ОТ-ПЦР – ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией; AdipoR – рецепторы к адипонектину; AMPK – AMP-активируемая протеинкиназа; DMSO – диметилсульфоксид; FCS – фетальная сыворотка крупного рогатого скота; IL-10 – интерлейкин-10; LXR – печеночные X-рецепторы; PBS – фосфатно-солевой буфер; PMA – форбол-12-миристат-13-ацетат; PPAR – рецептор активаторов пролиферации пероксисом; TNF – фактор некроза опухоли.

пероксисом (PPARa) и LXR (печеночные X-рецепторы) [24, 25].

Ранее было показано, что МФ человека синтезируют и секретируют апоЕ [26] и апоА-1 [27, 28]. Сверхэкспрессия генов этих апопротеинов в МФ мышей с атеросклерозом приводила к уменьшению площади атеросклеротических поражений [29, 30]. Влияние апоЕ и апоА-1 на атерогенез связывают с их участием в обратном транспорте холестерина из М $\Phi$  в печень [27, 31] и с иммуномодулирующим действием [27, 32, 33]. В частности, оба аполипопротеина подавляют стимулированную липополисахаридом выработку провоспалительных цитокинов in vitro [27, 32, 33]. Синтез обоих апопротеинов в МФ индуцируется накоплением в клетках холестерина и его окисленных форм посредством активации LXR [26, 28]. Экспрессия генов *ароА-1* и *ароЕ* в  $M\Phi$  регулируется также активностью рецепторов PPARα и PPARγ [26, 28, 34]. Кроме того, продукция апоА-1 и апоЕ МФ стимулируется провоспалительным цитокином TNF (фактор некроза опухоли) [27, 28, 35].

В данном исследовании мы проверили гипотезу о влиянии адипонектина на продукцию апоА-1 и апоЕ МФ. Выяснение этого вопроса позволит расширить представления о механизмах влияния адипонектина на процессы атерогенеза.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование макрофагов. Клетки моноцитарно-макрофагальной линии человека ТНР-1 (ЦКП "Коллекция клеточных культур позвоночных" Института цитологии РАН) культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе на полной среде RPMI-1640 с добавлением 4 мМ глутамина, 0.1 мг/мл гентамицина ("Биолот", Россия) и 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FCS; "Ну-Clone", США). Клетки высевали на 96-луночные культуральные планшеты ("Sarstedt", Германия) по  $2 \times 10^5$  клеток на лунку. Дифференцировку клеток в макрофагоподобные клетки (МФ ТНР-1) вызывали, добавляя к клеткам 50 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (РМА, "Sigma", США). Через 1 сут клетки отмывали от РМА и далее (спустя одни либо трое суток) инкубировали в течение 24 ч на среде без FCS с 10 мкг/мл адипонектина ("Biovendor", Чехия; RD172023100-С) либо с 10 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА; "Sigma", 4503), либо с добавлением такого же объема фосфатно-солевого буфера (PBS. "Биолот"). Таким образом, общее время дифференцировки МФ, включая этапы добавления РМА, выдерживания клеток без РМА и инкубации с адипонектином и другими агентами, составляло 3 или 5 сут. В некоторых экспериментах за 1 ч до добавления адипонектина и в течение всего срока инкубации к клеткам дополнительно добавляли: 10 мкМ МК-886 (антагонист РРАRα; "Sigma", С7081) либо 10 мкМ ТО-901317 (агонист LXR; "Sigma", Т2320), либо растворитель указанных агентов диметилсульфоксид (DMSO; "Биолот") в тех же концентрациях (≤0.5%). После окончания срока инкубации клетки собирали для выделения РНК либо для проведения проточной цитофлуориметрии, супернатанты отбирали для проведения иммуноферментного анализа (ИФА).

Мононуклеары периферической крови человека выделяли из цельной донорской крови центрифугированием в градиенте фиколла (плотность 1.077, "Биолот"). Клетки дважды промывали раствором Хенкса ("Биолот"), затем ресуспендировали в полной среде RPMI-1640 и высевали на 96-луночные планшеты  $(1.5 \times 10^5 \text{ клеток на лунку})$  [27]. Через 2 ч мононуклеары дважды отмывали от неадгезированных клеток раствором Хенкса, после чего клетки переводили в свежую культуральную среду с 10% FCS. Среду обновляли каждые 2-3 дня и на 7-е сутки дифференцировки к клеткам добавляли в условиях 2% FCS 10 мкг/мл адипонектина, либо БСА (10 мкг/мл). Клетки инкубировали в течение 1 сут и снимали для проведения проточной цитофлуориметрии реактивом "Accutase" ("ThermoFisher", США).

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР). Суммарную РНК выделяли из клеток при помощи реагента "Евроген" (Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию и степень очистки суммарной РНК в полученных препаратах определяли спектрофотометрически, целостность РНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Обратную транскрипцию проводили с использованием 1 мкг суммарной РНК, олиго-dT-праймеров, обратных праймеров к гену ароА-1 ("Синтол". Россия) и набора реактивов M-MLV ("Promega" США) по протоколу производителя. ПЦР в реальном времени проводили при помощи амплификатора CFX-96 ("Bio-Rad", США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green и наборов фирмы "Синтол" [27]. Праймеры подбирали с помощью программы Primer3 [36]. Последовательности праймеров к генам *ароА-1*, *ароЕ*, *TNF*, IL-10 и к референсным генам RPLP0 и PPIA описаны ранее [27, 37-39]. Последовательности праймеров к гену AdipoR1: 5'-ССТGGAAAATTT-GACATATGGTTC-3' и 5'-AGGCTCAGAGAAG-GGTGTCA-3' и к гену AdipoR2: 5'-CGGGGGAGTAA-GAGCAGGAG-3' и 5'-GGGCAGCTCCTGTGAT-GTAG-3'. Экспрессию искомых генов нормировали на среднее геометрическое значение экспрессии генов домашнего хозяйства RPLP0 и **PPIA.** Относительные значения количества мРНК искомого гена (в процентах от значений в контрольном образце) рассчитывали методом  $\Delta\Delta Ct$ , где Ct – пороговый цикл кривой флуоресценции.



**Рис. 1.** Экспрессия генов *ароА-1, ароЕ, TNF, IL-10 (а), AdipoR1* и *AdipoR2 (б)* в макрофагоподобных клетках линии THP-1 3 и 5 дней дифференцировки. Результаты количественной ОТ-ПЦР. Приведены средние значения  $\pm$  SEM (n = 10-12). \*p < 0.05, \*\*p < 0.001 – статистически значимые различия между группами 3- и 5-дневных МФ согласно непарному *t*-критерию Стьюдента.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Концентрацию апоА-1 в культуральных средах МФ определяли при помоши сэндвич-варианта ИФА с использованием нижних поликлональных козьих антител к апоА-1 человека ("R&D", США; АF-3664) в разведении 1:100 и конъюгатов антител к апоА-1 с пероксидазой хрена ("ИМТЕК", Россия; Р-GAH Laa) в разведении 1 : 250. Концентрацию апоЕ в культуральных средах определяли при помощи прямого варианта ИФА с использованием моноклональных антител мыши к апоЕ ("ИМТЕК". MGH Lee) в разведении 1 : 100 и конъюгатов козьих антител к Ig мыши с пероксидазой хрена ("Abcam", Великобритания; аb6006) в разведении 1 : 500. Зависимость значений  $A_{450}$  от lg концентраций определяемых веществ имела линейный характер, коэффициент линейной корреляции Пирсона составлял 0.992-0.999.

Проточная цитофлуориметрия. Поверхностный уровень апоА-1 макрофагов оценивали методом проточной цитофлуориметрии [40]. Использовали антитела мыши к апоА-1 ("Bio-Rad", 0650-0050) в разведении 1 : 200 и вторичные козьи антитела против Ід мыши, меченные Alexa-647, ("Cell Signaling", США; 4410) в разведении 1 : 500. Для контроля специфичности окраски клетки обрабатывали вторичными антителами без предварительной обработки антителами к апоА-1 (изотип-контроль). Анализ клеточных популяций проводили на проточном цитофлуориметре "Beckman Coulter's Navios Flow" (США). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения Kaluza Analysis ("Beckman Coulter", США).

Статистический анализ. Результаты представляли как среднее значение ± ошибка среднего (SEM). Каждый опыт повторяли 3–4 раза. Статистическую значимость различий оценивали с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента либо согласно критерию Даннета. Различия считали значимыми при p < 0.05. Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft, США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Экспрессия генов аполипопротеинов, цитокинов и рецепторов адипонектина в макрофагах в зависимости от времени дифференцировки

В ходе дифференцировки МФ экспрессия генов *ароА-1* и *ароЕ* возрастала (рис. 1*a*), что сопровождалось увеличением секреции данных апобелков (рис. 2*e*, *г*). Как и ожидалось, дифференцировка моноцитов в МФ в течение 3 дней приводила к повышению содержания мРНК цитокинов TNF и IL-10. Однако более длительная дифференцировка клеток приводила к уменьшению экспрессии генов этих цитокинов (рис. 1*a*) и секреции TNF (10.4 ± 0.5 и 1.7 ± 0.2 пг/мкг суммарной PHK 5- и 3-дневных МФ соответственно; p < 0.0001). При этом экспрессия генов рецепторов к адипонектину *AdipoR1* и *AdipoR2* в МФ разных сроков дифференцировки не изменялась (рис. 1*б*).

#### Влияние адипонектина на продукцию anoA-1 и anoE макрофагами

Добавление к клеткам 10 мкг/мл адипонектина, но не БСА в той же концентрации, приводило к повышению экспрессии гена *ароА-1* на уровне мРНК в 5-дневных МФ, но не в МФ, дифференцированных в течение 3 дней (рис. 2a,  $\delta$ ). При этом адипонектин не влиял на уровень экспрессии гена другого апобелка — *ароЕ* в МФ. Кроме того, адипонектин модулировал экспрессию генов



**Рис. 2.** Влияние адипонектина на экспрессию генов *ароА-1, ароЕ, TNF* и *IL-10* (a, b) в макрофагоподобных клетках линии THP-1, и содержание белков апо A-1 (b) и апо Е (c) в культуральных средах этих макрофагов. Приведены средние  $\pm$  SEM (a, b - n = 16; b, c - n = 8 - 10). \*p < 0.05 - статистически значимые отличия от контроля согласно непарному *t*-критерию Стьюдента. Адипо – адипонектин.

цитокинов — подавлял экспрессию гена *TNF* в МФ обоих сроков дифференцировки и повышал экспрессию гена *IL-10* в 5-дневных МФ (рис. 2a,  $\delta$ ). Содержание апоА-1 и апоЕ в культуральных средах МФ под действием адипонектина не изменялось (рис. 2e, e).

По данным проточной цитофлуориметрии адипонектин уменьшал уровень белка апоА-1 на поверхности 5-суточных МФ (рис. 3*a*). Эти данные подтверждены на первичных МФ, дифференцированных из мононуклеаров крови человека (рис. 3*б*). Таким образом, адипонектин модулирует продукцию апоА-1 МФ: повышает экспрессию гена *ароА-1* на уровне РНК, но при этом уменьшает количество его белкового продукта на поверхности клеток.

#### Роль ядерных рецепторов РРА Ra и LXR в модуляции экспрессии гена apoA-1 под действием адипонектина

Экспрессия гена *ароА-1* в МФ находится под контролем ядерных рецепторов: РРАRа (лиган-

дзависимый репрессор) и LXR (лигандзависимый активатор) [28]. В связи с этим для выяснения механизма влияния адипонектина на экспрессию гена *ароА-1* в МФ мы прединкубировали клетки с МК-886 — антагонистом ядерного рецептора PPARα, и TO-901317 – агонистом ядерных рецепторов LXR. Как и ожидалось, добавление к клеткам данных агентов приводило к стимуляции экспрессии гена ароА-1 (рис. 4). Прединкубация клеток с МК-886 приводила к значительному снижению стимуляции экспрессии гена ароА-1 адипонектином. в то время как ТО-901317 полностью отменял эффект адипонектина (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что адипонектин повышает синтез мРНК ароА-1 при участии PPARa и LXR.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Макрофаги — ключевые клетки, участвующие в атерогенезе. Атеросклероз представляет собой хронический воспалительный процесс, вызван-

700



**Рис. 3.** Влияние адипонектина на уровень поверхностного апоА-1 в макрофагоподобных клетках линии THP-1, дифференцированных в течение 5 дней (*a*), и в макрофагах, дифференцированных из мононуклеаров периферической крови человека в течение 7 дней (*б*). Представлены диаграммы распределения уровня поверхностного апоА-1, средние значения  $\pm$  SEM и % апоА-1-содержащих клеток. \**p* < 0.0001 – статистически значимые отличия от контроля (БСА) согласно непарному *t*-критерию Стьюдента.

ный очаговым накоплением ЛПНП в интиме крупных артерий [41]. Адипонектин не только влияет на привлечение мононуклеарных лейкопитов в очаг воспаления [14, 15], но и воздействует на функцию МФ: модулирует их дифференцировку и продукцию провоспалительных цитокинов [16-19], подавляет захват модифицированных ЛПНП [20–22], усиливает отток холестерина из  $M\Phi$  [22, 23]. В настоящей работе впервые показано, что адипонектин модулирует экспрессию гена *ароА-1* в М $\Phi$ , не влияя при этом на экспрессию гена *ароЕ* в этих клетках. Интересно, что адипонектин уменьшает экспрессию гена *TNF* в МФ обоих сроков дифференцировки и в то же время повышает экспрессию генов *ароА-1* и *IL-10* только в МФ, дифференцированных в течение 5 сут. Обусловлены ли указанные различия в действии адипонектина разной степенью дифференцированности МФ или разницей во времени покоя МФ после стимуляции РМА, остается невыясненным. По данным Starr и соавт. [42], МФ ТНР-1, дифференцированные в течение 5 дней, обладают более высокой экспрессией макрофагальных маркеров CD11b и CD14 на клеточной мембране, чем 2-дневные МФ, но при этом 5-дневные МФ остаются менее активированными, ввилу длительного периода покоя без РМА [43]. Последнее может объяснять снижение выработки цитокинов 5-суточными МФ по сравнению с МФ, дифференцированными в течение 3 дней (рис. 1*a*).

Стимуляция экспрессии гена *ароА-1* адипонектином не приводила к увеличению уровня



**Рис. 4.** Участие ядерных рецепторов РРАR $\alpha$  и LXR в стимуляции экспрессии гена *ароА-1* адипонектином в макрофагоподобных клетках линии THP-1, дифференцированных в течение 5 дней. За 1 ч до начала инкубации с адипонектином к клеткам добавляли либо 10 мкМ MK-886 (ингибитор РРАR $\alpha$ ), либо 10 мкМ TO-901317 (активатор LXR), либо растворитель данных агентов DMSO. Приведены средние значения ± SEM (n = 12). \*p < 0.01, \*p < 0.0001 – статистически значимые отличия от контроля с DMSO согласно критерию Даннета.

белка апоA-1 в культуральной среде  $M\Phi$ , что может быть обусловлено тем, что основная часть продуцируемого МФ апоА-1 остается на поверхности мембраны, будучи связанной с кассетным транспортером АВСА-1 и липидными рафтами [27]. Снижение уровня апоА-1 на поверхности МФ под действием адипонектина свидетельствует, вероятно, об активации сигналов апоА-1, что приводит к ускорению деградации апоА-1. Показано, что, помимо участия в обратном транспорте холестерина, апоА-1 модулирует продукцию цитокинов в МФ, активируя сигнальный механизм ABCA-1/JAK2/STAT3 [32]. Ранее было установлено, что адипонектин повышает экспрессию гена *АВСА-1* в МФ и активирует обратный транспорт холестерина [22, 23]. В какой мере продукция апоА-1 МФ опосредует влияние адипонектина на обратный транспорт холестерина и участие МФ в воспалительных реакциях, покажут будущие исслелования.

Экспрессия гена *ароА-1* в МФ, как и в гепатоцитах, зависит от взаимодействия ядерных рецепторов PPARα и LXR с регуляторной областью гена *ароА-1* [28, 37]. При этом в гепатоцитах РРАКа действует как лигандзависимый активатор транскрипции гена *ароА-1*, а LXR вызывает репрессию этого гена [37]. В МФ наблюдается зеркально противоположная картина: РРАВα действует как лигандзависимый репрессор, а LXR – как активатор транскрипции гена ароА-1 [28]. Нами показано участие обоих ядерных рецепторов в регуляции транскрипции гена *ароА-1* адипонектином (рис. 4). Адипонектин передает сигнал на указанные факторы транскрипции благодаря взаимодействию с рецепторами AdipoR1/2 и путем активации АМРК-киназы [24, 25].

Таким образом, показано, что адипонектин стимулирует экспрессию гена *ароА-1* в МФ на уровне мРНК, но при этом уменьшает содержание белка апоА-1 на мембране этих клеток. На продукцию другого аполипопротеина, апоЕ, в МФ адипонектин не влияет. В активации транскрипции гена *ароА-1* под действием адипонектина принимают участие ядерные рецепторы РРАR $\alpha$  и LXR. Влияние адипонектина на продукцию МФ апоА-1 можно рассматривать как один из путей его воздействия на атерогенез.

Авторы приносят благодарность И.В. Кудрявцеву и М.К. Серебряковой (Отдел иммунологии ИЭМ) за помощь в проведении проточной цитофлуориметрии и А.Д. Денисенко (Отдел биохимии ИЭМ) за ценные критические замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-07918).

В настоящей работе не использовали людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arita Y., Kihara S., Ouchi N., Takahashi M., Maeda K., Miyagawa J., Hotta K., Shimomura I., Nakamura T., Miyaoka K., Kuriyama H., Nishida M., Yamashita S., Okubo K., Matsubara K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Funahashi T., Matsuzawa Y. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 79–83.
- Танянский Д.А., Фирова Э.М., Шатилина Л.В., Денисенко А.Д. (2008) Адипонектин: снижение содержания при метаболическом синдроме и независимая связь с гипертриглицеридемией. *Кардиология.* 12, 20–25.
- Разгильдина Н.Д., Бровин Д.Л., Побожева И.А., Пантелеева А.А., Мирошникова В.В., Беляева О.Д., Баранова Е.И., Полякова Е.А., Беркович О.А., Пчелина С.Н. (2018) Экспрессия гена *ADIPOQ* в подкожной и интраабдоминальной жировой ткани у женщин с различной степенью ожирения. *Цитология*. **60**, 531–535.
- Wang Y., Zheng A., Yan Y., Song F., Kong Q., Qin S., Zhang D. (2014) Association between HMW adiponectin, HMW-total adiponectin ratio and early-onset coronary artery disease in Chinese population. *Atherosclerosis.* 235, 392–397.
- Wu Z.J., Cheng Y.J., Gu W.J., Aung L.H. (2014) Adiponectin is associated with increased mortality in patients with already established cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism.* 63, 1157–1166.
- Yamauchi T., Kamon J., Waki H., Imai Y., Shimozawa N., Hioki K., Uchida S., Ito Y., Takakuwa K., Matsui J., Takata M., Eto K., Terauchi Y., Komeda K., Tsunoda M., Murakami K., Ohnishi Y., Naitoh T., Yamamura K., Ueyama Y., Froguel P., Kimura S., Nagai R., Kadowaki T. (2003) Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. J. Biol. Chem. 278, 2461–2468.
- Wang X., Chen Q., Pu H., Wei Q., Duan M., Zhang C., Jiang T., Shou X., Zhang J., Yang Y. (2016) Adiponectin improves NF-κB-mediated inflammation and abates atherosclerosis progression in apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids Health Dis.* 15, 33.
- Bruce C.R., Mertz V.A., Heigenhauser G.J., Dyck D.J. (2005) The stimulatory effect of globular adiponectin on insulin-stimulated glucose uptake and fatty acid oxidation is impaired in skeletal muscle from obese subjects. *Diabetes.* 54, 3154–3160.
- Fu Y., Luo N., Klein R.L., Garvey W.T. (2005) Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J. Lipid Res.* 46, 1369–1379.
- Miller R.A., Chu Q., Le Lay J., Scherer P.E., Ahima R.S., Kaestner K.H., Foretz M., Viollet B., Birnbaum M.J. (2011) Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling. J. Clin. Invest. 121, 2518–2528.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 4 2021

- Qiao L., Zou C., van der Westhuyzen D.R., Shao J. (2008) Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism. *Diabetes*. 57, 1824–1833.
- Matsuura F., Oku H., Koseki M., Sandoval J. C., Yuasa-Kawase M., Tsubakio-Yamamoto K., Masuda D., Maeda N., Tsujii K., Ishigami M., Nishida M., Hirano K., Kihara S., Hori M., Shimomura I., Yamashita S. (2007) Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprotein assembly in the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 1091–1095.
- Neumeier M., Sigruener A., Eggenhofer E., Weigert J., Weiss T.S., Schaeffler A., Schlitt H.J., Aslanidis C., Piso P., Langmann T., Schmitz G., Schölmerich J., Buechler C. (2007) High molecular weight adiponectin reduces apolipoprotein B and E release in human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 543– 548.
- Ouchi N., Kihara S., Arita Y., Maeda K., Kuriyama H., Okamoto Y., Hotta K., Nishida M., Takahashi M., Nakamura T., Yamashita S., Funahashi T., Matsuzawa Y. (1999) Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation.* 100, 2473–2476.
- Wang Y., Wang X., Lau W. B., Yuan Y., Booth D., Li J.J., Scalia R., Preston K., Gao E., Koch W., Ma X.L. (2014) Adiponectin inhibits tumor necrosis factor-αinduced vascular inflammatory response via caveolinmediated ceramidase recruitment and activation *Circ. Res.* 114, 792–805.
- Folco E.J., Rocha V.Z., López-Ilasaca M., Libby P. (2009) Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. *J. Biol. Chem.* 284, 25569–25575.
- Ohashi K., Parker J.L., Ouchi N., Higuchi A., Vita J.A., Gokce N., Pedersen A.A., Kalthoff C., Tullin S., Sams A., Summer R., Walsh K. (2010) Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* 285, 6153–6160.
- Cheng X., Folco E.J., Shimizu K., Libby P. (2012) Adiponectin induces pro-inflammatory programs in human macrophages and CD4+ T cells. *J. Biol. Chem.* 287, 36896–36904.
- van Stijn C.M., Kim J., Lusis A.J., Barish G.D., Tangirala R.K. (2015) Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. *FASEB J.* 29, 636–649.
- Ouchi N., Kihara S., Arita Y., Nishida M., Matsuyama A., Okamoto Y., Ishigami M., Kuriyama H., Kishida K., Nishizawa H., Hotta K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Yamashita S., Funahashi T., Matsuzawa Y. (2001) Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. **103**, 1057–1063.
- Tian L., Luo N., Klein R.L., Chung B.H., Garvey W.T., Fu Y. (2009) Adiponectin reduces lipid accumulation in macrophage foam cells. *Atherosclerosis*. 202, 152–161.
- Wang M., Wang D., Zhang Y., Wang X., Liu Y., Xia M. (2013) Adiponectin increases macrophages cholesterol

efflux and suppresses foam cell formation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. **229**, 62–70.

- Tsubakio-Yamamoto K., Matsuura F., Koseki M., Oku H., Sandoval J.C., Inagaki M., Nakatani K., Nakaoka H., Kawase R., Yuasa-Kawase M., Masuda D., Ohama T., Maeda N., Nakagawa-Toyama Y., Ishigami M., Nishida M., Kihara S., Shimomura I., Yamashita S. (2008) Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 390–394.
- 24. Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S., Sugiyama T., Miyagishi M., Hara K., Tsunoda M., Murakami K., Ohteki T., Uchida S., Takekawa S., Waki H., Tsuno N.H., Shibata Y., Terauchi Y., Froguel P., Tobe K., Koyasu S., Taira K., Kitamura T., Shimizu T., Nagai R., Kadowaki T. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* **423**, 762–769.
- Kemmerer M., Wittig I., Richter F., Brüne B., Namgaladze D. (2016) AMPK activates LXRα and ABCA1 expression in human macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 78, 1–9.
- Laffitte B.A., Repa J.J., Joseph S.B., Wilpitz D.C., Kast H.R., Mangelsdorf D.J., Tontonoz P. (2001) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 507–512.
- Mogilenko D.A., Orlov S.V., Trulioff A.S., Ivanov A.V., Nagumanov V.K., Kudriavtsev I.V., Shavva V.S., Tanyanskiy D.A., Perevozchikov A.P. (2012) Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages. *FASEB J.* 26, 2019– 2030.
- Shavva V.S., Mogilenko D.A., Nekrasova E.V., Trulioff A.S., Kudriavtsev I.V., Larionova E.E., Babina A.V., Dizhe E.B., Missyul B.V., Orlov S.V. (2018) Tumor necrosis factor α stimulates endogenous apolipoprotein A-I expression and secretion by human monocytes and macrophages: role of MAP-kinases, NF-κB, and nuclear receptors PPARα and LXRs. *Mol. Cell. Biochem.* 448, 211–223.
- Major A.S., Dove D.E., Ishiguro H., Su Y.R., Brown A.M., Liu L., Carter K.J., Linton M.F., Fazio S. (2001) Increased cholesterol efflux in apolipoprotein AI (ApoAI)-producing macrophages as a mechanism for reduced atherosclerosis in ApoAI<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler*. *Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1790–1795.
- Fazio S., Babaev V.R., Burleigh M.E., Major A.S., Hasty A.H., Linton M.F. (2002) Physiological expression of macrophage apoE in the artery wall reduces atherosclerosis in severely hyperlipidemic mice. *J. Lipid Res.* 43, 1602–1609.
- Kockx M., Jessup W., Kritharides L. (2008) Regulation of endogenous apolipoprotein E secretion by macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1060–1067.
- 32. Yin K., Deng X., Mo Z.C., Zhao G.J., Jiang J., Cui L.B., Tan C.Z., We G.B., Fu Y., Tang C.K. (2011) Tristetraprolin-dependent post-transcriptional regulation of inflammatory cytokine mRNA expression by apolipoprotein A-I: role of ATP-binding membrane cassette transporter A1 and signal transducer and activator of transcription 3. J. Biol. Chem. 286, 13834–13845.

- Zhu Y., Kodvawala A., Hui D.Y. (2010) Apolipoprotein E inhibits toll-like receptor (TLR)-3- and TLR-4-mediated macrophage activation through distinct mechanisms. *Biochem. J.* 428, 47–54.
- Galetto R., Albajar M., Polanco J.I., Zakin M.M., Rodríguez-Rey J.C. (2001) Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region. *Biochemical J.* 357, 521–527.
- Duan H., Li Z., Mazzone T. (1995) Tumor necrosis factor-alpha modulates monocyte/macrophage apoprotein E gene expression. J. Clin. Invest. 96, 915–922.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. (2012) Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucl. Acids Res.* 40, e115.
- 37. Mogilenko D.A., Dizhe E.B., Shavva V.S., Lapikov I.A., Orlov S.V., Perevozchikov A.P. (2009) Role of the nuclear receptors HNF4 alpha, PPAR alpha, and LXRs in the TNF alpha-mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells. *Biochemistry.* 48, 11950–11960.
- Mogilenko D.A., Kudriavtsev I.V., Trulioff A.S., Shavva V.S., Dizhe E.B., Missyul B.V., Zhakhov A.V., Ischenko A.M., Perevozchikov A.P., Orlov S.V. (2012) Modified low density lipoprotein stimulates complement C3 expression and secretion via liver X receptor

and Toll-like receptor 4 activation in human macrophages. J. Biol. Chem. 287, 5954–5968.

- Shavva V.S., Bogomolova A.M., Nikitin A.A., Dizhe E.B., Tanyanskiy D.A., Efremov A.M., Oleinikova G.N., Perevozchikov A.P., Orlov S.V. (2017) Insulin-mediated downregulation of apolipoprotein A-I gene in human hepatoma cell line HepG2: the role of interaction between FOXO1 and LXRβ transcription factors. *J. Cell. Biochem.* 118, 382–396.
- Некрасова Е.В., Данько Е.В., Шавва В.С., Диже Э.Б., Олейникова Г.Н., Орлов С.В. (2020) Действие инсулина на экспрессию гена аполипопротеина А-I в макрофагах человека. *Мед. Акад. Журн.* 20(1), 65–74.
- Kasikara C., Doran A.C., Cai B., Tabas I. (2018) The role of non-resolving inflammation in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 128, 2713–2723.
- Starr T., Bauler T.J., Malik-Kale P., Steele-Mortimer O. (2018) The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella typhimurium*. *PLoS One*. 13, e0193601.
- 43. Lund M.E., To J., O'Brien B.A., Donnelly S. (2016) The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J. Immunol. Meth.* **430**, 64–70.

## THE INFLUENCE OF ADIPONECTIN ON PRODUCTION OF APOLIPOPROTEINS A-1 AND E BY HUMAN MACROPHAGES

D. A. Tanyanskiy<sup>1, \*</sup>, A. S. Trulioff<sup>1</sup>, E. V. Ageeva<sup>1</sup>, A. A. Nikitin<sup>1</sup>, V. S. Shavva<sup>1</sup>, and S. V. Orlov<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, 197376 Russia
<sup>2</sup> Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia
\*e-mail: dmitrv.athero@gmail.com

Adiponectin is an adipose tissue hormone, affecting energy and lipoprotein metabolism and modulating inflammatory responses. However, the role of this adipokine in atherogenesis remains poorly understood. The aim of this study was to investigate the effect of adiponectin on production of apolipoproteins (apo) A-1 and E by human macrophages (M $\Phi$ ). The study was conducted on macrophage-like cells of THP-1 cell line of two differentiation terms, 3 and 5 days (3 d and 5 d M $\Phi$ ). Adiponectin (10 mkg/mL) stimulated the expression of *apoA-1* gene at the mRNA level in 5 d M $\Phi$ , but not in 3 d M $\Phi$ . The level of apoE mRNA in M $\Phi$  under the action of adiponectin was not affected. Adiponectin suppressed macrophage *TNF* gene expression, while it induced the expression of *IL-10* gene in 5d M $\Phi$ . The secreted levels of apo A-1 and E proteins under the action of adiponectin in macrophages of both periods of differentiation remained unchanged, while the level of the surface apo A-1 protein in 5 d M $\Phi$  was decreasing. Incubation of 5 d M $\Phi$  with the antagonist of the PPAR $\alpha$ nuclear receptor, MK-886, or with the nuclear receptor LXR agonist, TO-901317, resulted in the cancellation of the stimulating effect of adiponectin on *apoA-1* gene expression. These data indicate that adiponectin, in addition to its anti-inflammatory action, has a modulating effect on production of apo A-1 by macrophages. The latter is probably one of the mechanisms of the influence of this adipokine on atherogenesis.

Keywords: adiponectin, atherosclerosis, macrophages, apolipoprotein A-1, apolipoprotein E