

СОДЕРЖАНИЕ

Том 56, номер 6, 2022

“РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ: ОТ ВИРУСОВ ДО КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА”

Специальный выпуск
(редактор-составитель Д.С. Карпов)

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ ВИРУСОВ

- Редактирование геномов бактериофагов – модификация модельных фагов T7, T5 и T3 при помощи рекомбинирования и SpCas9 селекции
А. Исаев, А. Андриянов, Е. Знобищева, Е. Зорин, Н. Морозова, К. Северинов 883
- Противовирусное действие рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 на модели вируса гепатита В *in vivo*
А. П. Костюшева, С. А. Брезгин, Н. И. Пономарева, И. А. Гонтарь, А. В. Никифорова, В. И. Гегечкори, В. Б. Ползуктова, К. А. Туркадзе, А. Е. Судьина, В. П. Чуланов, Д. С. Костюшев 884

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ БАКТЕРИЙ

- CRISPR-интерференция в регуляции экспрессии бактериальных генов (обзор)
Н. И. Надолинская, А. В. Гончаренко 892
- Геномная инженерия микобактерий
Д. К. Армянинова, Д. С. Карпов, М. С. Котлярова, А. В. Гончаренко 900
- Репарация двухцепочечных разрывов ДНК, генерируемых CRISPR-Cas9 в *Pseudomonas putida* KT2440
Н. Шараяев, L. Chacon-Machado, О. Мушарова, Е. Савицкая, К. Северинов 914

НОВЫЕ ГЕНОМНЫЕ РЕДАКТОРЫ

- Прокариотические белки-Аргонавты как инструмент биотехнологии
Е. В. Кропачева, Л. А. Лисицкая, А. А. Агапов, А. А. Мусабилов, А. В. Кульбачинский, Д. М. Есюнина 915

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ ДРОЖЖЕЙ

- Тест-система для оценки активности мутантных вариантов Cas9 в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*
Д. С. Спаская, А. И. Давлетшин, В. В. Тютяева, К. А. Кулагин, Д. Г. Гарбуз, Д. С. Карпов 937

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

- Редактирование геномов представителей трибы пшеницевые с использованием системы CRISPR/Cas
Б. Р. Кулуев, Е. В. Михайлова, А. Р. Кулуев, А. А. Галимова, Е. А. Заикина, Е. К. Хлесткина 949
- цис*-Пренилтрансферазы *Marchantia polymorpha*: филогенетический анализ и перспективы использования в качестве регуляторов синтеза антимикробных соединений
Л. Р. Валеева, С. М. Джабраилова, М. Р. Шарипова 969

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ ЧЕРВЕЙ

| | |
|---|-----|
| Трансгенез в червях: претенденты на идеальную модель <i>И. С. Сухих, М. Ю. Бирюков, А. Г. Блинов</i> | 983 |
|---|-----|

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

| | |
|---|------|
| Геномное редактирование в терапии наследственных заболеваний кожи <i>А. В. Иваненко, Н. А. Евтушенко, Н. Г. Гурская</i> | 990 |
| Эффективность активации генов при помощи систем трансактивации на основе CRISPR/dCas9 зависит от времени работы системы <i>А. С. Артюхов, Д. А. Доровский, А. В. Сорокина, К. М. Шакирова, Е. Д. Момотюк, Э. Б. Дашинимаев</i> | 1014 |
| Структурные элементы векторов на основе ДНК и РНК для доставки геномных редакторов в клетки высших эукариот <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> <i>А. А. Загоскин, М. В. Захарова, М. О. Нагорных</i> | 1023 |

ОБЗОРЫ

| | |
|--|------|
| Перспективы генетически кодируемых FLIM-индикаторов для количественной оценки внутриклеточных параметров <i>А. В. Мамонтова, Т. Р. Симонян, А. М. Богданов</i> | 1039 |
| Нарушение белкового гомеостаза в клетке как основа патогенеза нейродегенеративных заболеваний <i>М. С. Кухарский, М. У. Эверетт, О. А. Лыткина, М. А. Распопова, Е. А. Ковражкина, Р. К. Овчинников, А. И. Антохин, А. А. Московцев</i> | 1044 |
| Супрессор опухолей p53 и метаболизм меди: малоизвестная, но важная связь <i>С. А. Цымбал, А. Г. Рефельд, О. А. Кучур</i> | 1057 |

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

| | |
|---|------|
| Статус метилирования генов апоптоза и интенсивность апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови у лиц, подвергавшихся хроническому радиационному облучению <i>Е. А. Блинова, В. С. Никифоров, А. И. Котикова, М. А. Янишевская, А. В. Аклеев</i> | 1072 |
| Генетическая и молекулярная характеристика гена, гомологичного криптохрому DASH, из антарктических диатомей <i>Phaeodactylum tricornutum</i> ICE-H <i>М. L. An, J. L. Miao</i> | 1083 |

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

| | |
|---|------|
| Механизм вызванного мелиттином подтекания фосфатидилсерин-содержащих мембран <i>R. Wang, M.-Y. Shi, B.-B. Ma, J. Sheng</i> | 1085 |
| Transwell-моделирование гематоэнцефалического барьера <i>А. В. Петровская, Е. П. Барыкин, А. М. Тверской, К. Б. Варшавская, В. А. Митькевич, И. Ю. Петрушанко, А. А. Макаров</i> | 1086 |
| Высокая гетерогенность вируснейтрализующей и RBD-связывающей активности сывороточных антител у реконвалесцентов COVID-19 <i>Е. А. Астахова, М. Г. Бязрова, Г. М. Юсубалиева, В. Ф. Ларичев, В. П. Баклаушев, А. В. Филатов</i> | 1095 |
| Полная и лишённая D-бок изоформы PTTG1: влияние на пролиферацию клеток <i>Д. Е. Демин, Е. М. Стасевич, М. М. Мурашко, Е. А. Ткаченко, А. Н. Уварова, А. М. Шварц</i> | 1104 |

УДК 577.21

**РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ БАКТЕРИОФАГОВ – МОДИФИКАЦИЯ
МОДЕЛЬНЫХ ФАГОВ T7, T5 И T3 ПРИ ПОМОЩИ РЕКОМБИНИРОВАНИЯ
И SpCas9 СЕЛЕКЦИИ#**

© 2022 г. А. Исаев^{a, *}, А. Андриянов^a, Е. Знобищева^b, Е. Зорин^a,
Н. Морозова^b, К. Северинов^{a, b, c, **}

^a Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Москва, 143028 Россия

^b Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

^c Waksman Institute of Microbiology, Piscataway, NJ 08854 USA

*e-mail: tcft18@gmail.com

**e-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Поступила в редакцию 01.04.2022 г.

После доработки 22.05.2022 г.

Принята к публикации 22.05.2022 г.

Бактериофаги – вирусы, инфицирующие бактериальные клетки, – самые распространенные биологические объекты на Земле. Использование фагов в фундаментальных исследованиях и индустрии требует методов, позволяющих проводить редактирование их геномов. По сравнению с генетической инженерией бактерий, модификацию геномов фагов значительно затрудняет недостаток маркеров селекции и необходимость трудозатратной ручной проверки рекомбинантных/мутировавших вариантов. Развитие технологий CRISPR-Cas позволило решить эту проблему за счет использования принципа негативной селекции, т.е. подавления размножения фагов с родительским вариантом генома. В данной статье мы опишем методы, используемые для редактирования геномов фагов, а также их варианты, сопряженные с использованием технологий CRISPR-Cas. Мы также приводим собственные результаты применения данных технологий, позволивших внести точечные мутации, делеции и инсерции в геномы модельных фагов *Escherichia coli* T7, T5 и T3.

Ключевые слова: бактериофаг, CRISPR-Cas, редактирование генома, рекомбинирование, фаговая терапия, гомологичная рекомбинация, “перезагрузка” фага, T7, T5, T3

DOI: 10.31857/S002689842206009X

**Editing of Phage Genomes – Recombineering-Assisted SpCas9 Modification
of Model Coliphages T7, T5, and T3**

A. Isaev^{1, *}, A. Andriianov¹, E. Znobishcheva², E. Zorin¹, N. Morozova², and K. Severinov^{1, 2, 3, **}

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Moscow, 143028 Russia

² Peter the Great St Petersburg State Polytechnic University, Saint Petersburg, 195251 Russia

³ Waksman Institute of Microbiology, Piscataway, NJ 08854 USA

*e-mail: tcft18@gmail.com

**e-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Bacteriophages – viruses that infect bacterial cells – are the most abundant biological entities on Earth. The use of phages in fundamental research and industry requires tools for precise manipulation of their genomes. Yet, compared to bacterial genome engineering, modification of phage genomes is challenging because of the lack of selective markers and thus requires laborious screenings of recombinant/mutated phage variants. The development of the CRISPR-Cas technologies allowed to solve this issue by the implementation of negative selection that eliminates the parental phage genomes. In this manuscript, we summarize current methods of phage genome engineering and their coupling with CRISPR-Cas technologies. We also provide examples of our successful application of these methods for introduction of specific insertions, deletions, and point mutations in the genomes of model *Escherichia coli* lytic phages T7, T5, and T3.

Keywords: bacteriophage, CRISPR-Cas, genome editing, recombineering, phage therapy, homologous recombination, phage rebooting, T7, T5, T3

Статья представлена авторами на английском языке.

УДК 578.242.42/.44+578.282

ПРОТИВОВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ CRISPR/Cas9 НА МОДЕЛИ ВИРУСА ГЕПАТИТА В *in vivo*

© 2022 г. А. П. Костюшева^a, С. А. Брезгин^{a, b}, Н. И. Пономарева^{a, b}, И. А. Гоптарь^c,
А. В. Никифорова^c, В. И. Гегечкори^a, В. Б. Ползуктова^a, К. А. Туркадзе^a, А. Е. Судьина^d,
В. П. Чуланов^{a, b}, Д. С. Костюшев^{a, b, *}

^aПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения (Сеченовский университет), Москва, 119048 Россия

^bНаучно-технологический университет “Сириус”, Сочи, 354340 Россия

^cНаучно-исследовательский институт медицины труда, Москва, 105275 Россия

^dЦентр стратегического планирования Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 119121 Россия

*e-mail: dkostushev@gmail.com

Поступила в редакцию 31.03.2022 г.

После доработки 23.05.2022 г.

Принята к публикации 23.05.2022 г.

Хронический гепатит В (ХГВ) вызывается вирусом гепатита В (ВГВ) и представляет одну из ключевых проблем мирового здравоохранения. Современные методы терапии не позволяют полностью элиминировать ВГВ из инфицированных клеток и, следовательно, излечить хроническую форму инфекции. Системы сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 могут эффективно разрезать целевые последовательности ДНК, в том числе вирусные геномы. Разрезание основной формы генома ВГВ — кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) — приводит к значительному подавлению вирусной репликации, разрушению либо мутационной инактивации ккзДНК. К числу наиболее перспективных для “стерилизующего” излечения ХГВ, т.е. для полной элиминации вируса из организма, относятся подходы на основе CRISPR/Cas9. На модели ВГВ у мышей *in vivo* нами изучено противовирусное действие комплексов высокоспецифичного белка Cas9 и РНК-проводника, направленных на геном ВГВ. Показано, что однократная инъекция короткоживущих рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 уже к 48 ч снижает уровни ДНК ВГВ в сыворотке и печени мышей примерно в 10 раз, при этом в оставшихся ДНК ВГВ детектируются редкие мутации по типу вставок и делеций. Создание препаратов для лечения ХГВ на основе рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 в перспективе может существенно сократить сроки лечения и привести к полной элиминации вируса из организма.

Ключевые слова: генетическое редактирование, противовирусные препараты, геномные технологии, NGS

DOI: 10.31857/S002689842206012X

ВВЕДЕНИЕ

Хронический гепатит В (ХГВ) — тяжелое заболевание печени, вызываемое инфицированием гепатоцитов человека вирусом гепатита В (ВГВ). ХГВ встречается во всех странах земного шара, при этом наибольшее распространение ХГВ зарегистрировано в Азиатско-Тихоокеанском регионе, странах Африки и бассейне Амазонки, где до 8% населения являются носителями HBsAg ВГВ. В странах Восточной и Южной Европы, Ближнего Востока, Японии и ряде стран Южной Америки распространенность ХГВ варьирует в пределах 2–7%. В странах Северной Америки, Северной и Западной Европы, Австралии доля лиц с ХГВ в общей популяции составляет 0.5–2%. Распро-

страненность ХГВ в Российской Федерации составляет около 2% [1]. Несмотря на существование эффективной вакцины, а также ряда безопасных лекарственных препаратов, способных подавлять репликацию ВГВ, ХГВ остается одной из главных проблем мирового здравоохранения. При прекращении приема противовирусных препаратов происходит восстановление репликации ВГВ, ассоциированной с высокими рисками развития рака и цирроза печени [2]. Причина хронизации инфекции и высокой персистенции вируса — сложный жизненный цикл ВГВ, ориентированный на сохранение в ядре инфицированных клеток основной формы вирусного генома — кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК).

ккзДНК ВГВ представляет собой минихромосому, с которой считываются все вирусные РНК. Длительное (в течение всей жизни инфицированных) поддержание пула ккзДНК связано с высокой стабильностью минихромосом, а также с существованием механизмов восполнения пула ккзДНК за счет образования ккзДНК *de novo* из формы-предшественника. Пул ккзДНК восстанавливается за счет реинфекции (повторного заражения клеток), а также реимпорта геномной формы-предшественника в ядро [3].

Системы CRISPR/Cas9 считаются перспективными молекулярными инструментами, позволяющими осуществлять разработку препаратов для лечения ХГВ. Выраженная противовирусная активность различных систем CRISPR/Cas9 неоднократно показана на моделях ВГВ-инфекции *in vitro* и *in vivo* [4–12]. В ранних работах CRISPR/Cas9 доставляли с использованием ДНК-векторов на основе вирусов, тогда как в последнее время основное внимание привлекают невирусные методы доставки кодирующих мРНК Cas9/РНК-проводников [13] и РНП [14, 15]. Невирусные методы имеют несомненные преимущества как по эффективности действия CRISPR/Cas9, так и по безопасности (меньшая иммуногенность, меньшая вероятность внецелевого действия и др.) [16].

В нашей работе на модели ВГВ у мышей *in vivo* впервые оценен противовирусный эффект однократного введения РНП CRISPR/Cas9.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение РНК-проводника с помощью реакции транскрипции *in vitro*. Продукт ПЦР, кодирующий РНК-проводник под T7-промотором, получен с помощью Q5-полимеразы на основе продукта U6-PCR, как описано ранее [2]. В синтезе использовали праймеры *ultramerT7_f* и *St1_g*. ПЦР-продукт под T7-промотором служил матрицей для *in vitro* транскрипции (IVT) с использованием набора для синтеза РНК HiScribe Quick T7 High Yield (“NEB”, США) по протоколу производителя. Продукт реакции IVT инкубировали в течение ночи, а затем обрабатывали ДНКазой I (“New England Biolabs”, Великобритания) в течение 15 мин при 37°C с последующей очисткой изопропанолом. К реакционной смеси добавляли изопропанол и 0.5 М NaCl, центрифугировали в течение 30 мин. Далее осадок дважды промывали 70 и 95%-ным этанолом. Высушенный на воздухе осадок ресуспендировали в воде, свободной от РНКаз, и хранили при –80°C. Нуклеотидные последовательности спейсеров РНК-проводников и праймеры описаны ранее [6].

Получение и очистка белка Cas9. Белок нарабатывали в клетках *pLysS Escherichia coli* BL21 (DE3)

(“Novagen”). Клетки выращивали в среде LB (с добавлением соответствующего антибиотика, 0.5% сахарозы, 0.5% глицерина, 1 мМ хлорида магния, 50 мМ дигидрофосфата натрия, 50 мМ дигидрофосфата калия, 25 мМ сульфата аммония) при 30°C до OD₆₀₀ = 1.2. Экспрессию белка индуцировали 0.1 мМ IPTG в течение 16 ч при 18°C. Белок очищали с помощью аффинной и ионообменной хроматографии. Клетки ресуспендировали в 50 мМ буфере Трис-НCl pH 8.0, содержащем 500 мМ NaCl, 1 мМ PMSF, 0.2% Triton X-100, 0.1% Tween-20, обрабатывали ультразвуком на льду и центрифугировали при 15000 g в течение 40 мин. Осветленный лизат обрабатывали 0.05%-ным полиэтиленимином в течение 30 мин при 4°C, полученную суспензию центрифугировали при 15000 g в течение 40 мин. Супернатант связывали с Ni-хелатирующей сефарозой (“GE Healthcare”, США), промывали в 50 мМ буфере Трис-НCl pH 8.0, содержащем 500 мМ NaCl, 0.05% Igepal CA-630, и элюировали 50 мМ Трис-НCl pH 8.0 со 150 мМ NaCl, 0.3 М имидазола, 10% глицерина. Затем белок связывали с SP-сефарозой (“GE Healthcare”) в 50 мМ Трис-НCl-буфере pH 7.5, содержащем 150 мМ NaCl, 0.01% Triton X-100, 2 мМ ДТТ, элюировали линейным градиентом NaCl (150 мМ–1 М). Добавляли глицерин до 50% и хранили при –20°C.

Реакция разрезания ДНК-мишени *in vitro*. Плазмида 1.1-мерВГВ, содержащая 1.1 генома ВГВ (генотип D, подтип ayw), предоставлена Dieter Glebe (Giessen University, Германия). Рекомбинантный белок Cas9 смешивали с транскрибированным *in vitro* РНК-проводником в молярном соотношении 1 : 1 в буфере NEB3.1 и инкубировали в течение 10 мин для сборки РНП-комплексов. Затем в реакцию добавляли 200 нг плазмиды 1.1-мерВГВ. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C с последующей инактивацией при 95°C в течение 3 мин. Продукты разрезания визуализировали с помощью гель-электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле.

Эксперименты на мышах. Эксперименты проводили согласно [17] на мышах линии BALB/c (самцы 6–8 недель, по три особи в группе) с небольшими модификациями. Плазмиду 1.1-мерВГВ (4 мкг) вводили в хвостовую вену мышей в 0.9%-ном растворе NaCl, эквивалентном по массе 8% массы тела животного, в течение 5–8 с. Через 6 ч после гидродинамической инъекции в пробирках смешивали белок StCas9 и РНК-проводник St10 (либо контрольный РНК-проводник Stnc) в соотношении 3.15 мкг белка к 0.63 мкг РНК-проводника на мышь, смесь инкубировали в течение 10 мин для образования РНП-комплексов. Полученные РНП смешивали с 36 мкл реактива Lipofectamine3000 и инкубировали в течение 10 мин. Полученные липосомы вводили в хвостовую вену мышей. Через 48 ч после инъекции ВГВ-

кодирующих плазмид животных усыпляли в экзикаторе с хлороформом, подвергали дислокации шейных позвонков, затем проводили эксплантацию органов, забор крови и отделение плазмы. Печень мышей погружали в среду О.С.Т. (“SCIgen”, США), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Выделение нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью набора РИБО-преп (“AmpliSens”, Россия) по протоколу производителя. Образцы печени животных гомогенизировали с помощью прибора MagNA Lyser (“Hoffmann-La Roche”, Швейцария) по протоколу производителя, к гомогенату добавляли лизирующий буфер. ДНК ВГВ выделяли из плазмы мышей с помощью набора РИБО-преп (“AmpliSens”) по протоколу производителя. Образцы нуклеиновых кислот, выделенных из гомогената печени, использовали для анализа внутрипеченочной ДНК ВГВ с нормированием на ген β -глобина, в образцах плазмы определяли количество ДНК ВГВ.

ПЦР-анализ. Полуколичественную ПЦР проводили со специфическими праймерами и зондами TaqMan для ДНК ВГВ и гена β -глобина [7, 12] на приборе Rotor Gene 6000. Использовали праймеры на ДНК ВГВ и ген β -глобина из коммерческого набора AmpliSens HBV-FL и V31-FER-CE — AMPLISENS® HPV HCR-SCREEN (“AmpliSens”).

Иммуногистохимия. Криостатные срезы толщиной 6 мкм получены из блоков О.С.Т. печени мышей. Срезы фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. Срезы после отмывки в Трис-НСI (50 мМ, pH 8.0, 3 раза по 10 мин) инкубировали с блокирующим буфером (0.02% Triton X-100, 10% сыворотки лошади, 150 мМ NaCl в растворе Трис-НСI (50 мМ, pH 8.0)) в течение 30 мин. Далее срезы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными анти-НВсAg-антителами мыши (ab8637) и первичными анти-FLAG-антителами кролика (ab1162), отмывали 3 раза по 10 мин промывочным буфером (0.02% Triton X-100, 200 мМ NaCl в растворе Трис-НСI (50 мМ, pH 8.0)), а затем инкубировали со вторичными антимышиными антителами козы AlexaFluor488 (ab150105), вторичными антикроличьими антителами козы AlexaFluor594 (ab150080) и реактивом Hoechst33324 (“Abcam” ab228351, Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре. Срезы повторно промывали 3 раза по 10 мин промывочным буфером и фиксировали реагентом Fluoroshield (“Abcam” ab104135), визуализировали на флуоресцентном микроскопе Leica DMI6000 с иммерсионными объективами $\times 20$. Работу проводили с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

Высокопроизводительное секвенирование. Регион ДНК ВГВ, кодирующий РНК-проводник St10, амплифицировали с помощью высокоточной полимеразы Q5 (“New England Biolabs”, США) из образцов ДНК из ткани печени. Использовали праймеры:

Seq_f: 5'-ТТААСАГГССАТТГАТТГГААА-3';
Seq_r: 5'-САГАГГАГССГАААААГГТТС-3'. Ампликоны очищали на агарозном геле и выделяли с помощью набора Qiagen Gel Extraction Kit (“QIAGEN”, США), концентрацию ампликонов измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (“Life Technologies”, США). Далее проводили лигирование адапторов для секвенирования на платформе Illumina. Полученные библиотеки секвенировали с помощью парных прочтений на инструменте MiSeq (“Illumina”, США). Выравнивание на референсную последовательность и получение сборок проводили в программе Geneious. Количество вставок и делеций нуклеотидов в сборках подсчитывали с помощью кода Python (доступен на GitHub, https://github.com/babinyurii/crispr_cas9).

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7; попарные апостериорные сравнения проводили с помощью критерия Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка разрезания генома ВГВ РНП-комплексами CRISPR/Cas9

В работе мы использовали белок Cas9 *Streptococcus thermophilus* (StCas9) и высокоэффективный РНК-проводник St10, описанные ранее [6]. Для оценки возможности разрезания плазмиды 1.1-мерВГВ (плазида содержит 1.1-мер генома ВГВ под контролем цитомегаловирусного промотора) получены РНП CRISPR/Cas9, состоящие из рекомбинантного белка StCas9 и РНК-проводника St10, транскрибированного в реакции *in vitro*. При инкубации РНП CRISPR/Cas9 с ВГВ-кодирующей плазмидой (1 ч при 37°C) система StCas9-St10 эффективно разрешила ДНК-мишень, о чем можно судить по изменению электрофоретической подвижности линеаризованной плазмиды (рис. 1). Следовательно, полученные комплексы РНП CRISPR/Cas9 эффективно разрезают мишень ВГВ в плазмиде.

РНП CRISPR/Cas9 снижают уровни ДНК и НВсAg ВГВ *in vivo*

Плазмиду 1.1мерВГВ вводили в хвостовую вену мышей BALB/c с помощью гидродинамической инъекции. Через 6 ч с использованием реак-

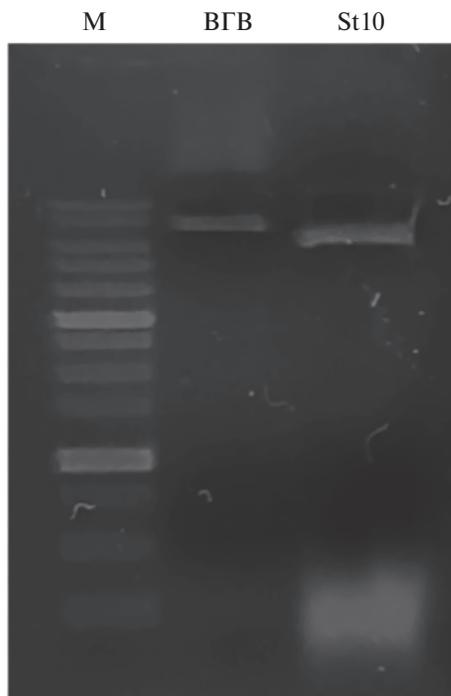


Рис. 1. Нуклеолитическое действие РНП StCas9 с РНК-проводником St10 с ВГВ-кодирующей плазмидой. М – маркер длин фрагментов ДНК; ВГВ – ВГВ-кодирующая плазида; St10 – ВГВ-кодирующая плазида, разрезанная комплексом StCas9 с РНК-проводником St10.

тива Lipofectamine 3000 проводили инъекцию РНП StCas9-St10. Контролем служили комплексы РНП StCas9-Stnc с некодирующим РНК-проводником. Противовирусное действие анализировали через 48 ч после начала эксперимента по уровню ДНК ВГВ в сыворотке крови и ткани печени, а также по иммуногистохимическому окрашиванию на НВсАг ВГВ. Для определения меченных FLAG StCas9-белков в гепатоцитах мыши проводили иммуногистохимическое окрашивание с антителами к FLAG (схема эксперимента представлена на рис. 2а).

В результате, к 48 ч после однократного введения РНП StCas9-St10 наблюдали снижение уровня ДНК ВГВ в сыворотке крови (ns, $p = 0.0520$) (рис. 2б) и в ткани печени примерно в 10 раз ($p = 0.0203$) (рис. 2в).

С использованием иммуногистохимического окрашивания на срезах печени выявлены многочисленные НВсАг-позитивные клетки, что подтверждает эффективную доставку ВГВ-кодирующих плазмид в гепатоциты при помощи гидродинамической инъекции. Сравнение групп StCas9-St10 и StCas9-Stnc показало незначительное снижение содержания (%) НВсАг-позитивных клеток в группе с ВГВ-таргетирующим РНК-проводником St10, однако эти различия оказались статисти-

чески незначимыми ($p = 0.1021$). Окрашивание на белок StCas9 не выявило клеток с внутриядерной локализацией StCas9, что может свидетельствовать либо об исчезновении короткоживущих РНП из ткани печени, либо о низкой эффективности доставки РНП в составе липосом.

Таким образом, на модели гидродинамической инъекции ВГВ *in vivo* нами впервые показана противовирусная активность однократно введенных короткоживущих комплексов РНП CRISPR/Cas9.

*Анализ генетического редактирования ДНК ВГВ при использовании StCas9 РНП *in vivo**

Разрезание генома ВГВ системами CRISPR/Cas9 приводит к значительному подавлению репликации вируса. Разрывы генома ВГВ, вызванные действием сайт-специфических нуклеаз, либо репарируются, как правило, со сдвигом рамок считывания [4], либо разрушаются [7]. Для оценки частоты мутаций в геноме ВГВ в ответ на РНП CRISPR/Cas9 из ткани печени мышей выделена ДНК ВГВ. Участок вирусного генома, фланкирующей мишень St10, был амплифицирован с помощью специфических праймеров и проанализирован с помощью высокопроизводительного секвенирования.

В результате, в образцах, полученных от контрольных мышей с StCas9-Stnc, не обнаружили мутаций по типу делеций и вставок нуклеотидов в целевом сайте В то же время, в группе мышей с таргетирующим РНК-проводником St10 детектируются редкие делеции и вставки нуклеотидов. Таким образом, частоты генетического редактирования внутрипеченочной ДНК ВГВ составляют 0.319693 – для делеций и 0.155376 – для вставок нуклеотидов на 1000 прочтений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эффективность противовирусного действия CRISPR/Cas9 на моделях ХГВ определяется множеством вирусологических, иммунологических, молекулярных и технических факторов (подробно рассмотрено в обзоре [16]). Наиболее перспективной для создания препаратов, эффективных при ХГВ, представляется доставка РНП CRISPR/Cas9 в гепатоциты человека с помощью функционализированных (гепатотропных) наночастиц. Быстрое разрезание вирусных геномов при минимальных рисках внецелевого разрезания короткоживущими РНП может обеспечивать широкое окно терапевтического действия с минимальными рисками развития токсических эффектов. Дополнительные уровни безопасности могут обеспечиваться высокоспецифичными вариантами Cas-белков (слитые белки и белки с увеличенной специфичностью, такие как eSpCas9, Нура-Cas9, Sniper-Cas9, evoCas9 и др.) [6, 16, 18], а также улучшен-

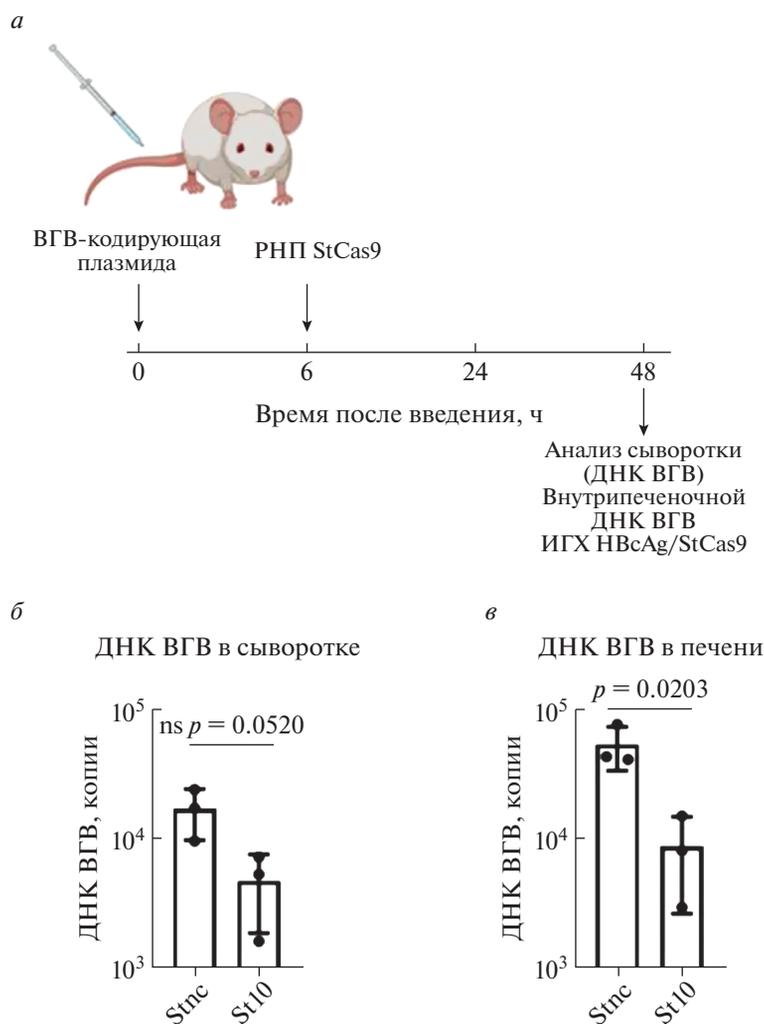


Рис. 2. Противовирусное действие РНП CRISPR/Cas9 на модели гидродинамической инъекции ВГВ-кодирующей плазмиды. *а* – Схема эксперимента. Анализ уровней ДНК ВГВ: ДНК ВГВ в сыворотке крови (*б*) и внутрипеченочная ДНК ВГВ (*в*) через 48 ч после инъекции. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. ns – статистически незначимые отличия. Рис. *а* создан в программе BioRender. ИГХ – иммуногистохимический анализ.

ными версиями РНК-проводников, в том числе, с помощью химических и генетических модификаций структуры РНК-проводников и отдельных нуклеотидов [19].

Создание эффективных и безопасных методов системной доставки РНП CRISPR/Cas9 является одним из ключевых направлений в области разработки лекарственных средств на основе технологий генетического редактирования. В последние годы создан ряд перспективных средств доставки, включая вирусоподобные частицы, биологические частицы, наночастицы на основе биополимеров, композитных материалов и др. [20, 21].

Нами впервые изучено противовирусное действие РНП CRISPR/Cas9 при его однократном введении на модели ВГВ у мышей *in vivo*. Однократное введение РНП CRISPR/Cas9, даже с учетом неоптимальной системы доставки в виде

коммерческих липосом, снижало примерно в 10 раз вирусную нагрузку по параметру ДНК ВГВ в сыворотке крови и печени мышей (рис. 2б, в). Процент ВГВ-положительных клеток (по параметру НВсАg) практически не изменялся, что можно объяснить как длительным периодом полужизни вирусных белков, так и неполной элиминацией вируса из инфицированных клеток. При анализе целевых мутаций, обусловленных действием CRISPR/Cas9, обнаружены редкие делеции и вставки нуклеотидов (частота ~0.1–0.3/1000 прочтений). Важно отметить, что схожие значения частоты мутаций в целевом сайте наблюдались в ходе длительной (до 62 суток) продукции CRISPR/Cas9 с аденоассоциированного вектора у гуманизированных мышей, инфицированных ВГВ [22]. Низкая частота мутаций в сайте целевого разрезания на моделях ВГВ с одновременным значительным

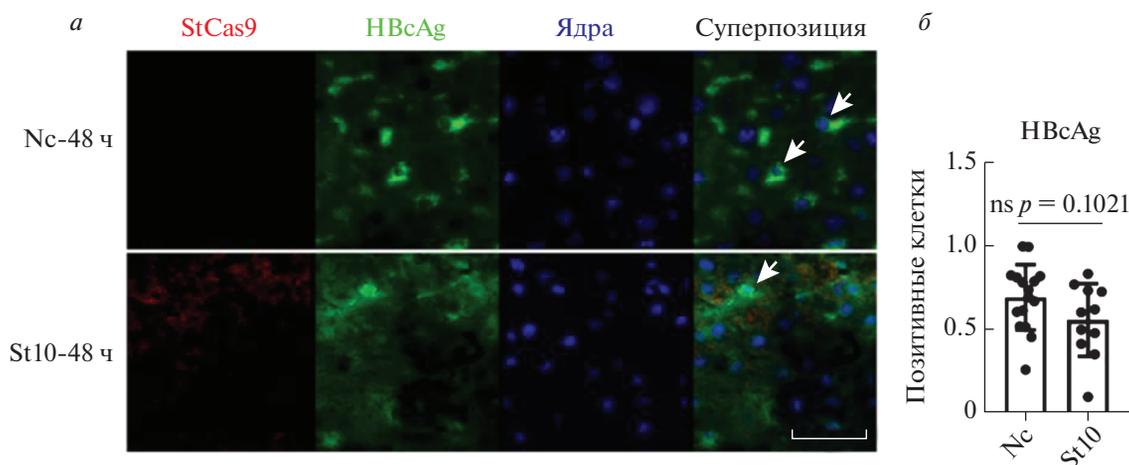


Рис. 3. Оценка StCas9- и HBVAg-позитивных клеток в гистологических срезах печени мышей. *a* – Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов печени мышей через 48 ч после инъекции: StCas9 (красное), HBVAg (зеленое), ядра клеток (синее). Размерная шкала 50 нм. *б* – Полуколичественная оценка содержания HBVAg-позитивных клеток в группах мышей (процент от общего числа клеток в видимом поле). Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. ns – статистически незначимые отличия.

подавлением вирусной нагрузки, скорее всего, связана с преимущественным разрушением вирусных геномов, как описано ранее [7].

Системы CRISPR/Cas9 позволяют в короткие сроки элиминировать большую часть геномов ВГВ из инфицированных клеток. Использование CRISPR/Cas9 в виде РНП в сочетании с невирусными методами доставки может существенно сократить процесс лечения пациентов с ХГВ и обеспечить полную элиминацию ВГВ из организма. Учитывая, что уже существуют подходы к созданию эффективных и безопасных комплексов CRISPR/Cas9 для разрезания ВГВ, ключевым барьером на пути использования систем генетического редактирования в клинической практике является отсутствие эффективных и безопасных средств системной доставки РНП.

Благодарим Юрия Бабина за помощь в анализе биоинформатических данных.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 20-15-00373).

Все процедуры, проведенные с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждений или принятой практике таких исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- World Health Organization (2017) *Global Hepatitis Report*, 2017.
- Чуланов В.П., Зуева А.П., Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Волчкова Е.В., Малеев В.В. (2017) Гепатит С стал излечим. Гепатит В – следующий? *Терапевтический архив*. **89**, 4–13.
- Ko C., Chakraborty A., Chou W.-M., Hasreiter J., Wetengel J.M., Stadler D., Bester R., Asen T., Zhang K., Wisskirchen K. (2018) Hepatitis B virus (HBV) genome recycling and de novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels. *J. Hepatol.* **69**(6), 1231–1241. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.08.012>
- Seeger C., Sohn J.A. (2016) Complete spectrum of CRISPR/Cas9-induced mutations on HBV cccDNA. *Mol. Ther.* **24**, 1258–1266. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.94>
- Seeger C., Sohn J.A. (2014) Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **3**, e216. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.68>
- Kostyushev D., Brezgin S., Kostyusheva A., Zarifyan D., Goptar I., Chulanov V. (2019) Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**(9), 1779–1794. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03021-8>
- Kostyushev D., Kostyusheva A., Brezgin S., Zarifyan D., Utkina A., Goptar I., Chulanov V. (2019) Suppressing the NHEJ pathway by DNA-PKcs inhibitor NU7026 prevents degradation of HBV cccDNA cleaved by CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* **9**, 1847.
- Li H., Sheng C., Liu H., Wang S., Zhao J., Yang L., Jia L., Li P., Wang L., Xie J., Xu D., Sun Y., Qiu S., Song H. (2018) Inhibition of HBV expression in HBV transgenic mice using AAV-delivered CRISPR-SaCas9. *Front. Immunol.* **9**, 2080. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02080>
- Lin S.-R., Yang H.-C., Kuo Y.-T., Liu C.-J., Yang T.-Y., Sung K.-C., Lin Y.-Y., Wang H.-Y., Wang C.-C., Shen Y.-C., Wu F.-Y., Kao J.-H., Chen D.-S., Chen P.-J. (2014) The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates *in vivo*.

- Mol. Ther. Nucl. Acids.* **3**, e186.
<https://doi.org/10.1038/mtna.2014.38>
10. Kennedy E.M., Kornepati A.V.R., Cullen B.R. (2015) Targeting hepatitis B virus cccDNA using CRISPR/Cas9. *Antiviral Res.* **123**, 188–192.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.10.004>
 11. Zhen S., Hua L., Liu Y.H., Gao L.C., Fu J., Wan D.Y., Dong L.H., Song H.F., Gao X. (2015) Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. *Gene Ther.* **22**, 404–412.
<https://doi.org/10.1038/gt.2015.2>
 12. Kostyusheva A.P., Kostyushev D.S., Brezgin S.A., Zarifyan D.N., Volchkova E.V., Chulanov V.P. (2019) Small molecular inhibitors of DNA double strand break repair pathways increase the anti-HBV activity of CRISPR/Cas9. *Mol. Biol.* **53**, 274–285.
 13. Jiang C., Mei M., Li B., Zhu X., Zu W., Tian Y., Wang Q., Guo Y., Dong Y., Tan X. (2017) A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and psc9 *in vivo*. *Cell. Res.* **27**, 440.
 14. Suzuki Y., Onuma H., Sato R., Sato Y., Hashiba A., Maeki M., Tokeshi M., Kayesh M.E.H., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K., Harashima H. (2021) Lipid nanoparticles loaded with ribonucleoprotein-oligonucleotide complexes synthesized using a microfluidic device exhibit robust genome editing and hepatitis B virus inhibition. *J. Control. Release.* **330**, 61–71.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.013>
 15. Wang D., Chen L., Li C., Long Q., Yang Q., Huang A., Tang H. (2022) CRISPR/Cas9 delivery by NIR-responsive biomimetic nanoparticles for targeted HBV therapy. *J. Nanobiotechnol.* **20**, 1–16.
 16. Kostyushev D., Kostyusheva A., Ponomareva N., Brezgin S., Chulanov V. (2021) CRISPR/Cas and hepatitis B therapy: technological advances and practical barriers. *Nucl. Acid Ther.* **32**(1), 14–28.
<https://doi.org/10.1089/nat.2021.0075>
 17. Li L., Li S., Zhou Y., Yang L., Zhou D., Yang Y., Lu M., Yang D., Song J. (2017) The dose of HBV genome contained plasmid has a great impact on HBV persistence in hydrodynamic injection mouse model. *Virology*. **14**, 1–11.
 18. Liu Y., Zhao M., Gong M., Xu Y., Xie C., Deng H., Li X., Wu H., Wang Z. (2018) Inhibition of hepatitis B virus replication via HBV DNA cleavage by Cas9 from *Staphylococcus aureus*. *Antiviral Res.* **152**, 58–67.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.02.011>
 19. Yin H., Song C.-Q., Suresh S., Wu Q., Walsh S., Rhym L.H., Mintzer E., Bolukbasi M.F., Zhu L.J., Kauffman K. (2017) Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral *in vivo* genome editing. *Nat. Biotechnol.* **35**, 1179–1187.
 20. Banskota S., Raguram A., Suh S., Du S.W., Davis J.R., Choi E.H., Wang X., Nielsen S.C., Newby G.A., Randolph P.B. (2022) Engineered virus-like particles for efficient *in vivo* delivery of therapeutic proteins. *Cell.* **185**(2), 250–265.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.021>
 21. Kostyushev D., Kostyusheva A., Brezgin S., Smirnov V., Volchkova E., Lukashov A., Chulanov V. (2020) Gene editing by extracellular vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7362.
 22. Stone D., Long K.R., Loprieno M.A., De Silva Felixge H.S., Kenkel E.J., Liley R.M., Rapp S., Roychoudhury P., Nguyen T., Stensland L., Colón-Thillet R., Klouser L.M., Weber N.D., Le C., Waggoner J., Goecker E.A., Li A.Z., Eichholz K., Corey L., Tyrell D.L., Greninger A.L., Huang M.-L., Polyak S.J., Aubert M., Sagartz J.E., Jerome K.R. (2020) CRISPR/Cas9 gene editing of hepatitis B virus in chronically infected humanized mice. *Mol. Ther. – Methods Clin. Dev.* **20**, 258–275.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.014>

Antiviral Activity of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes at Hepatitis B Virus Model *in vivo*

A. P. Kostyusheva¹, S. A. Brezgin^{1,2}, N. I. Ponomareva^{1,2}, I. A. Goptar³, A. V. Nikiforova³,
 V. I. Gegechkori¹, V. B. Poluektova¹, K. A. Turkadze¹, A. E. Sudina⁴,
 V. P. Chulanov^{1,2}, and D. S. Kostyushev^{1,2,*}

¹ *Martinsonsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases (Sechenov University), Moscow, 119048 Russia*

² *Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia*

³ *Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, 105275 Russia*

⁴ *Federal State Budgetary Institution Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119121 Russia*

*e-mail: dkostushev@gmail.com

Chronic hepatitis B (CHB) caused by hepatitis B virus (HBV) infection, is one of the key issues of global health. Complete elimination of HBV from infected cells and, therefore, cure of chronic infection cannot be achieved with the use of modern antivirals. CRISPR/Cas9 systems of site-specific nucleases can effectively cleave target DNA, including viral genomes. Cleavage of the major form of HBV genome, covalently closed circular DNA (cccDNA), results in robust reduction in viral replication, degradation or mutational inactivation of cccDNA. CRISPR/Cas9-based approaches are one of the most promising for achieving a “sterilizing”

cure of CHB, i.e. complete elimination of the virus from the body. In this study, we analyzed antiviral activity of a high-specificity Cas9 protein and an sgRNA targeting HBV genome, at HBV mouse model *in vivo*. We found that a single injection of short-lived ribonucleoprotein complexes of CRISPR/Cas9 results in ~10-fold reduction in HBV DNA levels in serum and liver of mice as early as 48 hours after the start of the experiment. The remaining HBV DNA templates were found to harbor rare indel mutations at the target site. Developing new antivirals for treating CHB based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes could substantially reduce duration of CHB therapy and, potentially, achieve complete elimination of viral infection.

Keywords: gene editing, antiviral drugs, deletions, insertions, genome technologies, NGS

УДК 577.21

CRISPR-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ (ОБЗОР)

© 2022 г. Н. И. Надолинская^а, *, А. В. Гончаренко^а^аИнститут биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: nioriss@gmail.com

Поступила в редакцию 28.03.2022 г.

После доработки 15.04.2022 г.

Принята к публикации 15.04.2022 г.

В обзоре рассмотрено применение системы CRISPR/Cas для получения нокдаунов целевых бактериальных генов путем CRISPR-опосредованной интерференции (CRISPRi). CRISPRi основана на сохранении способности инактивированной нуклеазы dCas в комплексе с направляющей РНК связывать целевую мишень, что приводит к обратимой репрессии выбранных генов. Описан принцип работы CRISPR/Cas и CRISPRi/dCas, приведены примеры применения CRISPRi с наиболее популярными у исследователей инактивированными нуклеазами dCas9 и dCas12a. Уделено внимание использованию CRISPRi-скрининга в полногеномных исследованиях, а также модульной системе выявления многих важных закономерностей на уровне генома Mobile-CRISPRi. Обсуждается использование CRISPRi для оптимизации биотехнологического производства малонил-КоА, *L*-лизина, *L*-глутамата и других продуктов.

Ключевые слова: CRISPR, CRISPR-интерференция, CRISPRi-скрининг, Mobile-CRISPRi, dCas9, dCas12a

DOI: 10.31857/S0026898422060167

ВВЕДЕНИЕ

Система редактирования геномов CRISPR/Cas основана на адаптивном иммунитете бактерий и архей [1]. При первой встрече с патогеном бактериальная клетка сохраняет фрагменты его ДНК в особых локусах CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Эти фрагменты называются спейсерами и фланкируются короткими палиндромными повторами. Также локусы CRISPR кодируют белки Cas (CRISPR-associated), нуклеазу и вспомогательный комплекс белков, которые узнают и разрезают инородную ДНК при повторной встрече с патогеном, фрагменты генома которого уже сохранены в CRISPR (рис. 1). В этом участвуют также две короткие РНК: crRNA (CRISPR RNA), которая связывает ДНК-мишень,

и транскрибирующая tracrRNA, с которой взаимодействует нуклеаза. Вместе эти РНК образуют одиночный гибрид crRNA:tracrRNA, который называется gRNA, или sgRNA (направляющая РНК) [2]. Нуклеаза Cas инактивирует нежелательную ДНК, внося в нее двухцепочечный разрыв. Второе обязательное условие работы Cas-белка – наличие особого, прилегающего к протоспейсеру мотива PAM (protospacer adjacent motif), короткой последовательности из двух–шести нуклеотидов, специфичной для разных Cas-нуклеаз.

CRISPR-системы подразделяются на два класса. Системы класса 1 содержат нуклеазу из нескольких субъединиц, в системах класса 2 нуклеазы состоят из одной субъединицы. Классы, в свою очередь, представлены несколькими типами: класс 1 – типами I, III и IV, класс 2 – типами II, V и VI [3].

В большинстве исследований используется система CRISPR/Cas9 из *Streptococcus pyogenes*, которая относится к типу II и распознает PAM NGG. Нуклеазы, даже принадлежащие к одному типу, могут существенно различаться. Так, CRISPR/Cas9 из *S. thermophilus* [4] распознает более длинные PAM, самые интересные для направленного редактирования – NNAGAAG, NNAGAAT, NNAGAAA, NNAGAAC, NNGGAAA (располо-

Сокращения: CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами); Cas – CRISPR-associated (ассоциированные с CRISPR); crRNA – CRISPR RNA (CRISPR-РНК); tracrRNA – trans-activating CRISPR RNA (транскрибирующая CRISPR-РНК); gRNA – guide RNA (направляющая РНК); sgRNA – single guide RNA (одиночная направляющая РНК); PAM – protospacer adjacent motif (мотив, примыкающий к протоспейсеру); CRISPRi – CRISPR-interferention (CRISPR-интерференция); RBS – ribosome binding site (сайт связывания рибосомы).

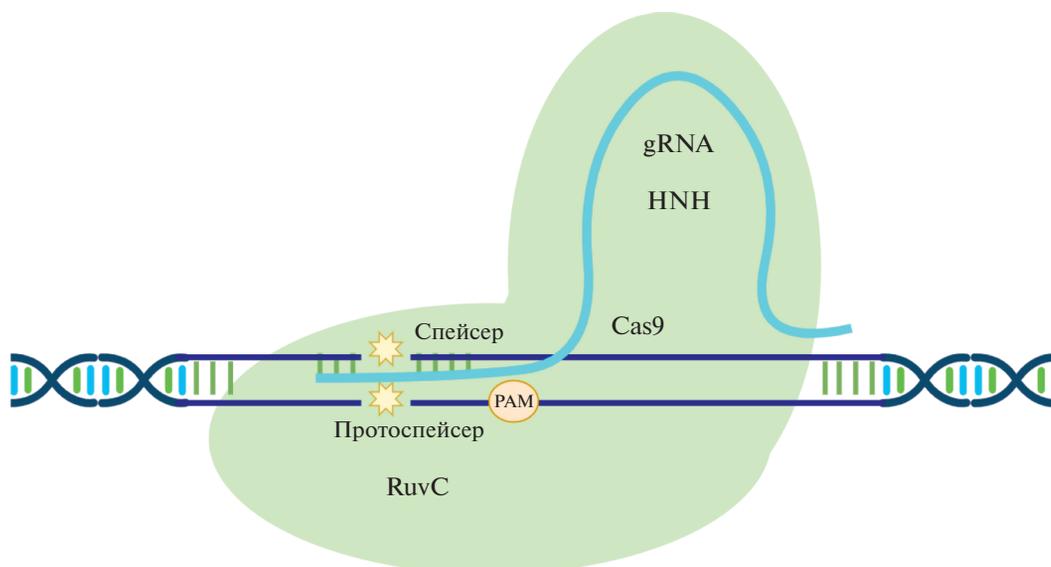


Рис. 1. Схема работы системы CRISPR/Cas9. gRNA узнает комплементарную мишень, имеющую PAM. Cas9 в комплексе с gRNA связывается с мишенью и вносит двухцепочечный разрез.

жены по убыванию силы связывания). Классификация CRISPR-систем дополнительно усложняется изменчивостью их элементов.

Простые и удобные в использовании системы CRISPR/Cas широко применяются в точечном редактировании прокариотических и эукариотических геномов. Система CRISPR/Cas считается очень удобным инструментом модификации ДНК, однако она не лишена недостатков. Во-первых, существует нецелевая активность Cas, обусловленная частичным нецелевым связыванием sgRNA в случайных местах генома [5]. Кроме того, Cas9 из *S. pyogenes* оказывает токсичное действие на клетки *Escherichia coli*, названное эффектом “bad-seed”. Механизм этого эффекта изучен не до конца, но известно, что он обусловлен специфическими пятью проксимальными к PAM нуклеотидами gRNA [6].

Различные модификации данного метода позволили не просто точно редактировать последовательность ДНК, но и управлять экспрессией целевых генов. В качестве примера такого приложения можно привести CRISPR-интерференцию (CRISPR-interferention, CRISPRi) [7] – процесс подавления экспрессии генов с помощью модифицированных CRISPR-систем (рис. 2).

Cas9 состоит из двух доменов, HNH и RuvC. Замены D10A в домене RuvC и H841A в HNH приводят к образованию инактивированной формы dCas9 [8]. Как и CRISPR/Cas, CRISPR/dCas9 распознает мишень с помощью gRNA и связывается с ней, образуя стерический блок, который препятствует элонгации транскрипции РНК-полимеразой [7]. Таким образом происходит репрессия гена-мишени. Простота и точность этой системы подавления экспрессии позволяет ре-

шать как фундаментальные, так и прикладные научные задачи. Правила и ограничения для нее такие же, как для соответствующих CRISPR/Cas. Индуцибельность и обратимость подавления экспрессии с помощью CRISPRi открывают широкое поле для экспериментов. В данном обзоре рассмотрены некоторые примеры регуляции экспрессии путем подавления транскрипции отдельных генов и изучения функций бактериальных генов с помощью CRISPRi и систем на ее основе.

CRISPRi НА ОСНОВЕ Cas9

Самый распространенный вариант CRISPRi – интерференция на основе dCas9. С использованием CRISPRi с dCas9 удалось подавить экспрессию генов в различных организмах. Некоторые примеры с описанием таких систем приведены ниже.

Много успешных работ по ингибированию генной экспрессии системой CRISPRi проведено на *E. coli*, как на самом популярном модельном организме. Depardieu и соавт. подробно рассмотрели варианты дизайна векторов для CRISPRi в *Staphylococcus aureus* и *E. coli* [9]. Описаны векторы pC194 и pLZ12, в которых *dcas9* контролируется аTc-зависимым промотором Ptet, а sgRNA – конститутивным промотором PpflB. На основе этих плазмид получена серия векторов pFD. Данные системы проверены интерференцией важного для *St. aureus* гена *rpsL*. Разработан также метод подбора векторов с оптимизированными сайтами связывания рибосом (RBS), что позволяет снизить токсичность при высоких уровнях экспрессии *dcas9*. Как уже упоминалось, механизм этого

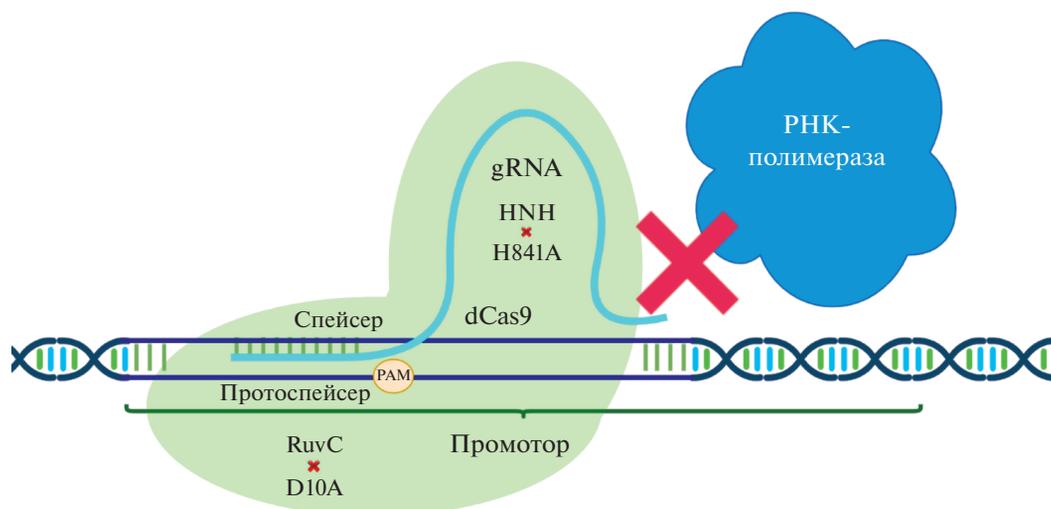


Рис. 2. Схема работы CRISPR-интерференции на основе системы CRISPR/Cas9. Инактивированный dCas9 в комплексе с gRNA узнает мишень и связывается с ней, но не может разрезать из-за отсутствия нуклеазной активности. Таким образом, dCas9 служит стерическим препятствием для РНК-полимеразы. Поскольку мишень расположена в промоторе, транскрипция не может продолжаться.

явления точно не установлен, согласно одной из гипотез, его можно устранить, корректируя уровень экспрессии. При помощи CRISPRi-скрининга осуществлен подбор и оптимизация RBS для устранения негативных эффектов dCas9 на примере репортерного гена *mCherry*. Библиотеку RBS в плазмиде pFD116 клонировали в клетках *E. coli*, после чего отбирали клоны, способные расти в присутствии аТс и при этом подавлять экспрессию *mCherry*. Таким образом отобраны RBS, которые не вызывают летальной токсичности dCas9, но позволяют эффективно работать системе интерференции.

Проведено также успешное ингибирование генов *St. aureus* путем CRISPRi [10]. На основе плазмиды pRMC2 [11] сконструирована плаزمиды pSD1. В ней *dcas9* экспрессируется под контролем АТс-индуцируемого промотора PtetO, а экспрессия sgRNA контролируется конститутивным промотором Ppf1B из *St. aureus* [12]. Эта система позволила обратимо подавить экспрессию как отдельных генов (ген альфа-токсина *hla*), так и генов в составе оперона (оперон *ccrAB*, состоящий из двух генов – *ccrA* и *ccrB*).

С целью исследования физиологии *Bacillus subtilis* при помощи CRISPRi сделаны нокдауны всех важных генов этой бактерии [13]. В этой работе система CRISPR/dCas9 работала под ксилозозависимым промотором P_{xyl}, sgRNA экспрессировалась под сильным конститутивным промотором P_{veg}. В результате была получена библиотека нокдаунов основных генов, позволяющая изучать их функции *in vivo*, обнаружены новые потенциальные мишени лекарственных средств, и проведен функциональный анализ генов.

С помощью CRISPRi и dCas9 из *S. pasteurianus* осуществлена успешная регуляция экспрессии генов у нескольких видов *Pseudomonas* spp. [14]. В этой работе использовали двухплазмидную систему, состоящую из векторов pBx-Spas-sgRNA с направляющей РНК и интегративного pUC18-mini-Tn7T-Lac-dCas9, несущего dCas9. *dcas9*, оптимизированный для микобактерий [4], был клонирован в интегративный вектор pUC18-mini-Tn7T-Gm-Lac [15]. В зависимости от вида организма использовали комбинации нескольких промоторных систем (TetR-Ptet, LacI-Plac, AraC-Para); экспрессия *dcas9* под разными промоторами различалась даже у близкородственных видов *Pseudomonas*. Плазмиды, несущая sgRNA, pBx-Spas-sgRNA, сконструирована путем клонирования sgRNA под промотор Ptet в плазмиде pBBR1.

Исследование проведено на различных генах: *gdhA* (NADP-зависимая глутаматдегидрогеназа *P. aeruginosa*), *ftsZ* (белок клеточного деления *P. aeruginosa*, *P. putida* и *P. fluorescens*), *ftsJ* в качестве примера плохо изученных генов (аннотирован как важный ген). Эффект CRISPRi показан на примере двух разных генов одновременно – *pvdH* (участвует в синтезе пиовердина) и *flgB* (один из белков базального тела жгутиков). Успешно осуществлено ингибирование всех этих генов и их комбинаций.

Подавление генной экспрессии в микоплазмах (*Mycoplasma pneumoniae*) и минимальных синтетических клетках JCVI-syn1.0 *Mycoplasma mycoides* служит очередным примером регуляции работы генов с помощью CRISPRi [16]. Показано индуцируемое ослабление экспрессии гена *mCherry*, кодирующего флуоресцентный белок, и гена

ksgA, связанного с чувствительностью к антибиотик-у касугамицину, в клетках JCVI-syn1.0 с помощью CRISPRi [17] (использовали промотор, регулируемый Tet). Также впервые показана успешная работа CRISPRi на минимальных синтетических клетках. Для *Mycoplasma pneumoniae* созданы векторы на основе системы Cre-lox [18]. Кодон-оптимизированный *dcas9* *S. pyogenes* под промотором P_{xyl}/tetO2mod из вектора pΔMG_217Cre и sgRNA из плазмиды miniTnPac_dCas9ind работали в модифицированном минитранспозоне TnPac из системы Cre-lox. *dcas9* амплифицирован из плазмиды pdCas9-bacteria [8], далее была собрана конструкция P_{xyl}/tetO2-dCas9-mCherry, в которую для подавления экспрессии введена gRNA.

Еще одна важная группа микроорганизмов, для которой актуально использование новых методов редактирования — микобактерии. Микобактерии представляют собой трудный объект для редактирования генома классическими методами, что обусловлено низкой эффективностью гомологичной рекомбинации, медленным ростом некоторых видов и GC-богатым составом генома. Поэтому успешное применение редактирования и подавления экспрессии генов с участием CRISPR и CRISPRi востребовано для изучения генома *Mycobacterium tuberculosis* и родственных бактерий.

Для применения CRISPRi в микобактериях на основе плазмиды pTetR сконструирована плазида pGrna, несущая aTc-зависимый промотор P_{myc1tetO}, *dcas9*, кассету sgRNA с сайтами для клонирования специфичных к мишени последовательностей, *dcas9*-связывающую шпильку и терминатор транскрипции из *S. pyogenes* [19]. Систему CRISPRi использовали для интерференции семи микобактериальных генов с различным уровнем экспрессии: Rv1713 (*engA*), Rv2150c (*ftsZ*), Rv2460c (*clpP2*), Rv3417c (*groEL1*), Rv3418c (*groES*), Rv3596c (*clpC1*) и Rv3921c (*gidC*). Достигнуто значительное подавление экспрессии всех этих генов. С помощью этой системы исследовали также важность отдельных генов, критичных для жизнеспособности микобактерий — определяли рост клеток в отсутствие экспрессии предположительно необходимых генов и способность CRISPRi к подавлению оперонов. Показано, что этот подход может эффективно применяться в исследованиях, предполагающих подавление экспрессии генов.

Другой пример CRISPRi в микобактериях — исследование вклада аденилатциклаз в вирулентность микобактерий туберкулеза [20]. С этой целью использовали двухплазмидную систему [4] из вектора pRH2502, экспрессирующего *dcas9*, и pRH2521, экспрессирующего sgRNA. Для снижения токсичного эффекта экспрессии dCas9 применяли dCas9 из *S. thermophilus*.

CRISPRi НА ОСНОВЕ Cas12a

Фермент Cas12a *Francisella novicida* (Cpf1) — минимальный фермент CRISPR класса 2 типа V [21], не требует дополнительно tracrRNA и является альтернативой Cas9 в CRISPR. Мишенью Cas12a служит матричная цепь ДНК. Таким образом, в некоторых случаях для процессинга crRNA достаточно только массива CRISPR. CRISPR/Cas12a адаптирована к редактированию различных организмов [22–24] и к CRISPRi.

Например, для микобактерий разработана простая, регулируемая и обратимая система CRISPRi на основе dCas12a [25], представленная плазмидами pJEBTZ и pJOBTZ. Вектор pJEBTZ содержит селективный маркер Zeo из *psigE*, ориджин репликации *E. coli* из pJEB402-dCas10 и кодон-оптимизированный dFn-Cpf1 из pTE4999. Путем замены промотора MOPS на TetR-регулируемый промотор p766 (вектор pJR965) из плазмиды pJEBTZ получен вектор pJOBTZ. Вектор pNFCF, несущий массивы crPHK, получен из pDTCF путем замены промотора Uv15-Tet на TetR-регулируемый промотор p766. dCas12a стабильно экспрессировался в *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. Подавление транскрипции проверили на штамме с аутолюминесценцией. Использование нескольких спейсеров давало более выраженный эффект, чем каждый из них по отдельности. Люминесценция падала в зависимости от количества спейсеров, пацеленных на оперон; три спейсера обеспечивали максимальный нокдаун. Проведено ингибирование транскрипции эндогенных генов *M. smegmatis* и их множественный нокдаун. Систему также адаптировали для работы в *M. tuberculosis*, в том числе и для мультигенного подавления генов *pknH*, *fadD2*, *amiC*, *luxD* и *rv0147*.

CRISPRi-СКРИНИНГ

Системы CRISPRi нашли применение и в полногеномных исследованиях, причем их эффективность оказалась не ниже, чем в существующих подходах [26–30]. При этом CRISPRi-скрининг оказался не столь трудозатратным.

CRISPRi-технология позволяет нацеливать многочисленные sgRNA практически на любое место генома, соответствующее критериям их подбора. В результате этого появляется возможность создания библиотеки sgRNA для полногеномных исследований и выявления многих важных закономерностей на уровне генома. CRISPRi-скрининг обладает такими значимыми преимуществами [6], как

- простота подготовки библиотек для секвенирования;
- возможность изучать повторяющиеся последовательности путем нацеливания sgRNA;

- возможность нацеливания на определенные положения или подмножества генов;
- управление экспрессией библиотеки за счет регулируемости системы.

CRISPRi используется во многих геномных исследованиях. Так, проведена серия работ по CRISPRi-скринингу в *E. coli* [6, 31]. Показано, что метод позволяет уточнить и скорректировать функции критически важных генов. Сначала на основе вектора psgRNAcos создали библиотеку из ~92000 sgRNA [31], подобранных случайным образом из всех возможных для выбранного штамма sgRNA. Полногеномное исследование, проведенное с помощью этой библиотеки, позволило установить и/или подтвердить основные правила работы CRISPR-систем, среди которых важно отметить эффект “bad-seed” – уже упоминавшуюся токсичность dCas9, которую удалось частично преодолеть в дальнейшем. С помощью такого скрининга можно определить гены, чувствительные к минимальному снижению экспрессии, важные мишени антибиотиков, идентифицировать случаи нетипичной геномной организации [6].

С помощью CRISPRi-скрининга проведен также анализ метаболической сети в клетках *E. coli*. Исследование ауксотрофных генов показало чувствительность и точность системы при сопоставлении генотипа с фенотипом. Идентифицированы гены, отвечающие за химическую устойчивость [32]. dCas9 из *S. pyogenes* работал в серии плазмид pdCas9-J23109-116. Вектор для экспрессии sgRNA получен из pTargetF путем замены маркера спектиномицина кассетой экспрессии ампициллина, лишенной сайта рестрикции BsaI. Исходный промотор в этом случае заменили синтетическим индуцибельным промотором PLacO-160.

MOBILE-CRISPRi

Mobile-CRISPRi – это набор систем CRISPRi, которые можно переносить с помощью конъюгации в различные виды бактерий [33]. Система состоит из набора модулей, которые можно комбинировать между собой за счет наличия сайтов рестрикции, таких как:

- гены устойчивости к антибиотикам;
- репортерные гены;
- ген sgRNA с существующим спейсером или сайтами для клонирования новых спейсеров;
- гены регуляции промотора;
- промотор *dcas9* и RBS;
- ген *dcas9*.

Эффективность системы установлена на γ -протеобактериях и Firmicutes путем как подавления отдельных генов, так и работы с библиотекой. Mobile-CRISPRi облегчает работу с немодельными организмами. Для создания векторов Mobile-

CRISPRi ориджин репликации pUC в плазмиде транспозона Tn7 pTJ1 заменили на ориджин репликации R6K- γ , чтобы векторы не смогли реплицироваться в клетках-реципиентах. Основным вектором при конструировании производных Mobile-CRISPRi на основе Tn7 был pJMP1055. Различные модули, интегрированные в этот вектор, перечислены выше. Наборы Mobile-CRISPRi делятся на векторы на основе ICEBs1 для грамположительных бактерий, которые встраиваются после гена tPHK *Leu2*, и векторы на основе Tn7 для грамотрицательных бактерий, которые встраиваются после гена *glmS*. Эти векторы различаются механизмом переноса [34]. При нацеливании спейсера sgRNA на определенный ген два олигонуклеотида отжигаются так, что образуется желаемая последовательность спейсера sgRNA с липкими концами для дальнейшего лигирования в плазмиду Mobile-CRISPRi.

ПРИКЛАДНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ CRISPRi

Метод CRISPRi применяется не только в фундаментальных исследованиях, но и для оптимизации биотехнологических производств. Например, проведенная Wu и соавт. CRISPRi-оптимизация биотехнологического процесса позволила повысить выход важных метаболитов, в том числе внутриклеточного малонил-КоА, имеющего большое значение в промышленном биосинтезе в качестве предшественника [35]. С этой целью провели тонкую настройку путей биосинтеза, направленную на усиление синтеза малонил-КоА, при помощи полного или частичного подавления экспрессии генов других путей биосинтеза. Кодон-оптимизированный *dcas9* из *S. pyogenes* встроили в вектор pACYCDuet-1 под промотор T7, вместе с ним в совместимом векторе pCOLA-Duet-1 под T7c-индуцируемым промотором экспрессировались sgRNA. Подавление экспрессии многих генов (*ppsA*, *eno*, *adhE*, *mdh*, *fumC*, *sdhA*, *sucC* и *citE*) привело к увеличению выхода целевого продукта за счет корректировки метаболических путей.

С помощью CRISPRi регулировали также экспрессию оперона, содержащего гены пути биосинтеза мевалоната, в клетках *E. coli* [36]. В этом случае система CRISPRi была представлена плазмидой pSECRi, в которой *dcas9* экспрессировался под индуцируемым *L*-рамнозой промотором с кассетой sgRNA из pACCRi.

Подавление гена *sad* посредством CRISPRi позволило повысить эффективность производства P(3НВ-со-4НВ), важного для пищевой промышленности [37].

Интерференция генов путей биосинтеза *n*-бутанола в различных комбинациях (последовательно и одновременно) в клетках *E. coli* (*pta*, *frdA*,

ldhA и *adhE*) путем CRISPRi приводила к существенному повышению выхода продукта [38]. Для репрессии каждого гена подобраны sgRNA, которые экспрессировались в векторе pSECRi-PFLA вместе с *dcas9*. При этом экспрессия *dcas9* находилась под контролем индуцируемого *L*-рамной промотора, а sgRNA – под конститутивным промотором J23119.

CRISPRi успешно использовали для подавления экспрессии *spo0A* в клетках промышленно важных клостридий (*Clostridium beijerinckii*) [39]. Этот ген кодирует важный регулятор спорообразования и продукции ацетона, бутанола, этанола [40]. *dcas9* вместе с sgRNA (в касете Pj23119-sgRNA-*spo0A*) экспрессировался под конститутивными промоторами P_{ptb} и Pj23119 в векторе dCASC_{spo0A}.

Бактерии *Corynebacterium glutamicum* широко используются в производстве аминокислот. Множественное подавление экспрессии генов *pgi*, *pck* и *ruk* [41] привело к повышению продукции *L*-лизина и *L*-глутамата этими бактериями. Чтобы получить такие результаты, dCas9 *S. pyogenes* клонировали из плазмиды pPP208 в репликативные плазмиды pZ8-P_{tac} и pZ8-Prp *C. glutamicum* под индуцируемыми IPTG или пропионатом промоторами соответственно; sgRNA экспрессировали под контролем промотора P_{tac} в репликативной плазмиде pAL374.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология CRISPR, которую изначально использовали только для редактирования генома, постоянно модифицируется и находит все более широкое применение.

Одно из популярных приложений CRISPR – CRISPRi, обеспечивающая надежное подавление генной экспрессии, применяется как для непосредственного ингибирования транскрипции целевого гена, так и при проведении полногеномных скринингов, а также в более инновационных инструментах, таких как модульные системы Mobile-CRISPRi. Все эти подходы актуальны не только для широкого круга бактерий, но и в работе с эукариотами. Они расширяют фундаментальные знания и имеют большую практическую значимость в биотехнологии и медицине.

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. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. **337**, 816–821.
2. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. **471**, 602–607.
3. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **37**, 67–78.
4. Rock J.M., Hopkins F.F., Chavez A., Diallo M., Chase M.R., Gerrick E.R., Pritchard J.R., Church G.M., Rubin E.J., Sasseti C.M., Schnappinger D., Fortune S.M. (2017) Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat. Microbiol.* **2**, 162–174.
5. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini L.A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* **31**, 233–239.
6. Rousset F., Cui L., Siouve E., Becavin C., Depardieu F., Bikard D. (2018) Genome-wide CRISPR-dCas9 screens in *E. coli* identify essential genes and phage host factors. *PLoS Genet.* **14**, e1007749.
7. Larson M.H., Gilbert L.A., Wang X., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S. (2013) CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat. Protoc.* **8**, 2180–2196.
8. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. **152**, 1173–1183.
9. Depardieu F., Bikard D. (2020) Gene silencing with CRISPRi in bacteria and optimization of dCas9 expression levels. *Methods*. **172**, 61–75.
10. Zhao C., Shu X., Sun B. (2017) Construction of a gene knockdown system based on catalytically inactive (“Dead”) Cas9 (dCas9) in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00291-17.
11. Corrigan R.M., Foster T.J. (2009) An improved tetracycline-inducible expression vector for *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*. **61**, 126–129.
12. Pagels M., Fuchs S., Pané-Farré J., Kohler C., Menschner L., Hecker M., McNamarra P.J., Bauer M.C., Von Wachenfeldt C., Liebeke M., Lalk M., Sander G., Von Eiff C., Proctor R.A., Engelmann S. (2010) Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **76**, 1142–1161.
13. Peters J.M., Colavin A., Shi H., Czarny T.L., Larson M.H., Wong S., Hawkins J.S., Lu C.H.S., Koo B.-M., Marta E., Shiver A.L., Whitehead E.H., Weissman J.S., Brown E.D., Qi L.S., Huang K.C., Gross C.A. (2016) A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria. *Cell*. **165**, 1493–1506.

14. Tan S.Z., Reisch C.R., Prather K.L.J. (2018) A robust CRISPR interference gene repression system in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* **200**, e00575–17.
15. Choi K.-H., Schweizer H.P. (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc.* **1**, 153–161.
16. Mariscal A.M., Kakizawa S., Hsu J.Y., Tanaka K., González-González L., Broto A., Querol E., Lluch-Senar M., Piñero-Lambea C., Sun L., Weyman P.D., Wise K.S., Merryman C., Tse G., Moore A.J., Hutchison C.A., Smith H.O., Tomita M., Venter J.C., Glass J.I., Piñol J., Suzuki Y. (2018) Tuning gene activity by inducible and targeted regulation of gene expression in minimal bacterial cells. *ACS Synth. Biol.* **7**, 1538–1552.
17. Hutchison C.A., Chuang R.-Y., Noskov V.N., Assad-Garcia N., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Gill J., Kannan K., Karas B.J., Ma L., Pelletier J.F., Qi Z.-Q., Richter R.A., Strychalski E.A., Sun L., Suzuki Y., Tsvetanova B., Wise K.S., Smith H.O., Glass J.I., Merryman C., Gibson D.G., Venter J.C. (2016) Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*. **351**, aad6253.
18. Mariscal A.M., González-González L., Querol E., Piñol J. (2016) All-in-one construct for genome engineering using Cre-lox technology. *DNA Res.* **23**, 263–270.
19. Choudhary E., Thakur P., Pareek M., Agarwal N. (2015) Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria. *Nat. Commun.* **6**, 62–67.
20. Nadolinskaia N.I., Zamakhaev M.V., Shumkov M.S., Armianinova D.K., Karpov D.S., Goncharenko A.V. (2021) CRISPR interference of adenylate cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl. Biochem. Microbiol.* **57**, 421–425.
21. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. **163**, 759–771.
22. Li L., Wei K., Zheng G., Liu X., Chen S., Jiang W., Lu Y. (2018) CRISPR-Cpf1-assisted multiplex genome editing and transcriptional repression in *Streptomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, e00827–18.
23. Choi S.Y., Woo H.M. (2020) CRISPRi-dCas12a: a dCas12a-mediated CRISPR interference for repression of multiple genes and metabolic engineering in cyanobacteria. *ACS Synth. Biol.* **9**, 2351–2361.
24. Zhang X., Wang J., Cheng Q., Zheng X., Zhao G., Wang J. (2017) Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1. *Cell Discov.* **3**, 17018.
25. Fleck N., Grundner C. (2021) A Cas12a-based CRISPR interference system for multigene regulation in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **297**, 100990.
26. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
27. Koo B.-M., Kritikos G., Farelli J.D., Todor H., Tong K., Kimsey H., Wapinski I., Galardini M., Cabal A., Peters J.M., Hachmann A.-B., Rudner D.Z., Allen K.N., Typas A., Gross C.A. (2017) Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst.* **4**, 291–305.e7.
28. Freed E.F., Winkler J.D., Weiss S.J., Garst A.D., Mutalik V.K., Arkin A.P., Knight R., Gill R.T. (2015) Genome-wide tuning of protein expression levels to rapidly engineer microbial traits. *ACS Synth. Biol.* **4**, 1244–1253.
29. Garst A.D., Bassalo M.C., Pines G., Lynch S.A., Halweg-Edwards A.L., Liu R., Liang L., Wang Z., Zeitoun R., Alexander W.G., Gill R.T. (2017) Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering. *Nat. Biotechnol.* **35**, 48–55.
30. van Opijnen T., Bodi K.L., Camilli A. (2009) Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat. Methods*. **6**, 767–772.
31. Cui L., Vigouroux A., Rousset F., Varet H., Khanna V., Bikard D. (2018) A CRISPRi screen in *E. coli* reveals sequence-specific toxicity of dCas9. *Nat. Commun.* **9**, 191–192.
32. Wang T., Guan C., Guo J., Liu B., Wu Y., Xie Z., Zhang C., Xing X.-H. (2018) Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance. *Nat. Commun.* **9**, 24–75.
33. Peters J.M., Koo B.-M., Patino R., Heussler G.E., Hearne C.C., Qu J., Inclan Y.F., Hawkins J.S., Lu C.H.S., Silvis M.R., Harden M.M., Osadnik H., Peters J.E., Engel J.N., Dutton R.J., Grossman A.D., Gross C.A., Rosenberg O.S. (2019) Enabling genetic analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi. *Nat. Microbiol.* **4**, 244–250.
34. Banta A.B., Ward R.D., Tran J.S., Bacon E.E., Peters J.M. (2020) Programmable gene knockdown in diverse bacteria using mobile-CRISPRi. *Curr. Protoc. Microbiol.* **59**, e130.
35. Wu J., Du G., Chen J., Zhou J. (2015) Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **5**, 13477.
36. Kim S.K., Han G.H., Seong W., Kim H., Kim S.-W., Lee D.-H., Lee S.-G. (2016) CRISPR interference-guided balancing of a biosynthetic mevalonate pathway increases terpenoid production. *Metab. Eng.* **38**, 228–240.
37. Lv L., Ren Y.-L., Chen J.-C., Wu Q., Chen G.-Q. (2015) Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: controllable P(3HB-co-4HB) biosynthesis. *Metab. Eng.* **29**, 160–168.
38. Kim S.K., Seong W., Han G.H., Lee D.-H., Lee S.-G. (2017) CRISPR interference-guided multiplex repression of endogenous competing pathway genes for redirecting metabolic flux in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **16**, 188.

39. Li Q., Chen J., Minton N.P., Zhang Y., Wen Z., Liu J., Yang H., Zeng Z., Ren X., Yang J., Gu Y., Jiang W., Jiang Y., Yang S. (2016) CRISPR-based genome editing and expression control systems in *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*. *Biotechnol. J.* **11**, 961–972.
40. Harris L.M., Welker N.E., Papoutsakis E.T. (2002) Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0a* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Bacteriol.* **184**, 3586–3597.
41. Cleto S., Jensen J.V.K., Wendisch V.F., Lu T.K. (2016) *Corynebacterium glutamicum* metabolic engineering with CRISPR interference (CRISPRi). *ACS Synth. Biol.* **5**, 375–385.

CRISPR-Interference in Regulation Bacterial Gene Expression (Review)

N. I. Nadolinskaia¹, * and A. V. Goncharenko¹

¹*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: nioriss@gmail.com*

The review is devoted to the use of the CRISPR/Cas system for obtaining knockdowns of target bacterial genes by CRISPR-mediated interference (CRISPRi). CRISPRi is based on the preservation of the ability of the inactivated dCas nuclease in complex with the guide RNA to bind the target, which leads to reversible repression of the selected genes. The review describes the principle of operation of CRISPR/Cas and CRISPRi/dCas and provides examples of various approaches to the use of CRISPRi with the most popular inactivated nucleases dCas9 and dCas12a among researchers. Also, attention is paid to the use of CRISPRi screening for genome-wide studies and the modular system for identifying many important patterns at the Mobile-CRISPRi genome level. In addition, we discuss the use of CRISPRi to optimize biotechnological productions, such as the synthesis of malonyl-CoA, *L*-lysine, *L*-glutamate, and other significant products.

Keywords: CRISPR, CRISPR interference, CRISPRi screening, Mobile-CRISPRi, dCas9, dCas12a

УДК 577.21

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКОБАКТЕРИЙ

© 2022 г. Д. К. Армянинова^а, *, Д. С. Карпов^б, М. С. Котлярова^а, А. В. Гончаренко^а^аФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия^бЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*e-mail: dasha.arm@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 26.04.2022 г.

Принята к публикации 28.04.2022 г.

Генетические инструменты, позволяющие целенаправленно изменять геном микобактерий, способствуют развитию наших представлений о физиологии и механизмах вирулентности микроорганизмов этой группы. Особенно важным представляется изучение таких патогенов человека и животных, как возбудители туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis complex*, и лепры – *Mycobacterium leprae*. Проведение генетических исследований открывает новые возможности для идентификации и валидации новых мишеней антибактериальных препаратов и разработки более совершенных вакцин. Несмотря на сложности работы с микобактериями, обусловленные их медленным ростом и ограниченной возможностью переноса генетической информации, достигнуты значительные успехи в разработке методов геномной инженерии этих микроорганизмов. В нашем обзоре рассмотрены основные подходы к целенаправленным изменениям генома микобактерий, такие как гомологичная и сайт-специфическая рекомбинация и применение системы CRISPR/Cas.

Ключевые слова: *Mycobacterium* spp., геномное редактирование, гомологичная рекомбинация, сайт-специфическая рекомбинация, CRISPR/Cas

DOI: 10.31857/S0026898422060040

ВВЕДЕНИЕ

Род *Mycobacterium* включает патогенные и свободноживущие виды. К наиболее важным патогенным микобактериям относятся *M. tuberculosis complex* и *M. leprae*, вызывающие туберкулез и лепру (проказу) соответственно, тогда как *M. avium complex*, *M. abscessus*, *M. ulfans* и *M. fortuitum* относятся к условно-патогенным микроорганизмам человека. Многие виды микобактерий являются свободноживущими. Вид *M. neoaurum* рассматривают как продуцент стероидных соединений для фармацевтики [1].

M. tuberculosis вызывает туберкулез – широко распространенное и опасное инфекционное за-

болевание, являющееся одной из 10 основных причин смертности в мире. *M. tuberculosis* может выживать и размножаться в макрофагах и других иммунокомпетентных клетках, вызывая поражение лимфоидных тканей, легких и других органов [2, 3]. Туберкулез требует длительного лечения, а распространение штаммов с широкой и множественной лекарственной устойчивостью представляет глобальную медицинскую проблему. Внесение целенаправленных изменений в геном микроорганизмов позволяет изучать связь между их генотипом и физиологическими особенностями, а также молекулярные взаимодействия с окружающей средой или с организмом хозяина. Это особенно важно, так как функция значительной части генов *M. tuberculosis* не установлена, несмотря на определение их нуклеотидных последовательностей [4, 5].

Микобактерии являются сложным для генетической манипуляций объектом. Представители группы *M. tuberculosis complex* относятся к медленнорастущим бактериям, которым требуется от 7 дней до 3 недель и более для образования колоний на плотных питательных средах. Микобакте-

Сокращения: БЦЖ – бацилла Кальметта–Герена (аттенуированная профилактическая противотуберкулезная живая вакцина); ПЦР – полимеразная цепная реакция; CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; Cas (CRISPR associated protein) – белок, ассоциированный с CRISPR; crRNA (CRISPR RNA) – CRISPR РНК; tracrRNA (trans-activating CRISPR RNA) – транскрибирующая CRISPR РНК; PAM (protospacer adjacent motif) – мотив, примыкающий к протоспейсеру.

рии обладают гидрофобной клеточной стенкой, состоящей из липидов, миколовых кислот, полисахаридов и пептидогликана. Эти компоненты обеспечивают рост микобактерий в виде плотной пленки и предотвращают эффективное поглощение ДНК. Несмотря на это, разработаны молекулярно-генетические методы, позволяющие трансформировать микобактерии экзогенной ДНК и значительно расширяющие возможности исследователей, в отношении модификации их генома [6, 7].

Методы геномного редактирования позволяют вносить направленные изменения в геном микобактерий. Создание мутантных штаммов с нокаутом выбранных генов, штаммов с условными нокаутами и штаммов со сверхэкспрессией выбранных генов необходимо для проведения функциональных исследований и поиска мишеней для новых лекарственных препаратов [8–10]. Введение точечных замен позволяет изучать лекарственную устойчивость, которая может развиваться вследствие таких мутаций в генах, кодирующих мишени лекарственных средств или ферменты, участвующие в их модификациях внутри клетки, а также в регуляторных областях этих генов [11].

В результате успешного редактирования генома *M. bovis* штамм ВСЖ (БЦЖ) были улучшены его протективные свойства. Однако БЦЖ часто не может обеспечить надежную защиту, особенно взрослого населения [12, 13]. На основе штамма БЦЖ разработана вакцина VPM1002, успешно проходящая клинические испытания [14]. Рекомбинантный штамм VPM1002 получен путем делеции гена *ureC*, кодирующего уреазу, и интеграции гена *hly* из *Listeria monocytogenes*, кодирующего листериолизин О. Повышенная протективность вакцинного штамма обусловлена способностью клеток выходить из фагосомы при понижении pH за счет действия листериолизина О, в то время как удаление гена уреазы из генома препятствует защелачиванию среды микобактериями [15]. Разработана также рекомбинантная живая вакцина MТВАС на основе *M. tuberculosis*, преимуществом которой перед БЦЖ является расширенный набор протективных антигенов. Вакцинный штамм MТВАС получен путем последовательного введения безмаркерных делеций двух генов — *fadD26* и *phoP* — значимых для вирулентности бактерий [16]. В настоящее время новая вакцина проходит вторую фазу клинических испытаний.

В представленном обзоре описаны основные подходы к редактированию геномов микобактерий с использованием гомологичной рекомбинации, интеграции микобактериофагов и систем CRISPR/Cas.

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКОБАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ

Возможность вносить целенаправленные изменения в геном микроорганизмов чрезвычайно важна для изучения функций генов и получения штаммов с заданными свойствами. Основным подходом к выявлению функций гена является получение его нокаута или нокаута и последующая комплементация геном дикого типа. Заменить выбранный аллель мутантным можно с помощью механизма гомологичной рекомбинации.

Нокаут гена получают путем аллельного обмена, требующего прохождения двух кроссинговеров с обеих сторон от вводимой мутации (рис. 1). С этой целью в клетки вносят вектор, несущий модифицированный (например, разрушенный вставкой гена резистентности) аллель целевого гена, фланкированный с обеих сторон участками гомологии (рис. 1а). Первые эксперименты по аллельному обмену на микобактериях проводили с использованием систем такого типа. Они имели ограниченный успех, что было связано с низкой эффективностью трансформации и малой частотой гомологичной рекомбинации в этих микроорганизмах, а также с высокой частотой нелегитимной рекомбинации. Предполагалось, что использование линейного фрагмента должно увеличить частоту гомологичной рекомбинации, однако включение внесенной линейной ДНК чаще происходило без замены целевого участка в геноме [4]. Установлено, что эффективность аллельного обмена как у быстро-, так и у медленно-растущих видов можно повысить при использовании векторов в виде оцДНК (продукт щелочной денатурации или фагемидная оцДНК) или УФ-облученной дцДНК [17].

Сохранение в геноме маркерного гена, обеспечивающего устойчивость к какому-либо антибиотику, затрудняет дальнейшее применение рекомбинантного штамма в биомедицинских приложениях. Вставка гена устойчивости к антибиотикам может оказывать полярный эффект на экспрессию нижестоящих генов в опероне, что влияет на получаемый фенотип и усложняет его характеристику. Кроме того, интеграция кассеты устойчивости к антибиотикам в хромосому исключает этот маркер из дальнейших генетических манипуляций [18]. Решить проблемы нежелательности присутствия генов антибиотикорезистентности при получении серии нокаутов позволяют системы, основанные на использовании сайт-специфичных систем рекомбинации, полученных из бактериофагов или транспозонов (рис. 1б).

Удаление генов антибиотикорезистентности, интегрированных в геном бактерий в ходе гомологичной рекомбинации, можно осуществить с помощью рекомбиназы FLP *Saccharomyces cerevisiae*.

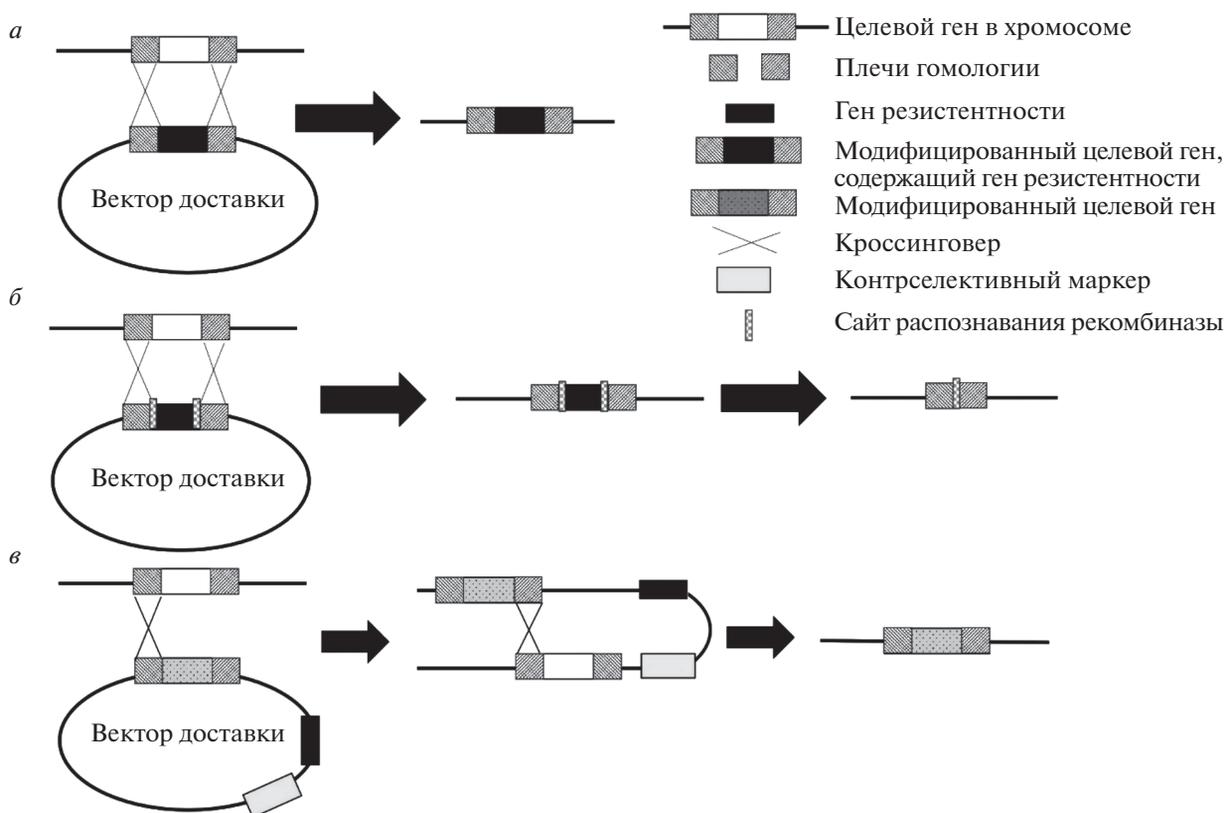


Рис. 1. Схемы получения нокаутов и других модификаций целевых генов методом гомологичной рекомбинации. *а* – Получение маркированного мутанта методом гомологичной рекомбинации. Клетки трансформируют вектором, несущим модифицированный аллель гена, содержащий ген резистентности. Отбирают мутантов, в которых кроссинговер произошел по обеим сторонам от вводимой мутации. *б* – Схема получения немаркированного нокаута с использованием сайт-специфичной рекомбинации. Используется конструкция, содержащая модифицированный аллель, несущий ген резистентности, окруженный сайтами распознавания рекомбиназы. Аллельный обмен осуществляется в один этап, после отбора мутантов ген резистентности удаляется рекомбиназой. *в* – Схема двухэтапного получения немаркированных мутантов с использованием суицидного вектора. Конструируется суицидный вектор, несущий модифицированный аллель целевого гена и кассету, содержащую маркерный ген, соединенный с контрселективным маркером. После трансформации клетки высевают на среду, содержащую антибиотик, для отбора мутантов, в которых произошел первый кроссинговер, в результате чего тело вектора интегрируется в хромосому. Далее полученные мутанты проходят второе событие кроссинговера и подвергаются негативному отбору, в результате чего выживают только те мутанты, которые потеряли контрселективный маркер, а вместе с ним и селективный маркер.

siae. Эта рекомбиназа, как показано, функциональна в клетках *M. smegmatis* и опосредует сайт-специфичную рекомбинацию между двумя сайтами *FRT* в хромосоме [19]. Если ген устойчивости к гиромоцину окружить двумя мишенями распознавания *FLP* (*FRT*) в прямой ориентации, то ген *hug* специфично удаляется из хромосомы мутантов *M. smegmatis* при экспрессии гена *FLP* [19]. Дополнительная оптимизация кодонов гена *FLP_m* привела к более эффективной работе системы в *M. smegmatis*, а также обеспечила возможность ее использования в медленно растущих микобактериях. Так, в эксперименте на *M. bovis* BCG около 40% резистентных клонов потеряли кассету устойчивости *hug* после кратковременной экспрессии гена *FLP_m*. Секвенирование хромосомной ДНК показало специфичность вырезания кассеты *FRT-hyg-FRT* с помощью *FLP* [20].

По тому же принципу работает система из бактериофага P1: кассету с маркером устойчивости окружают сайтами узнавания *loxP*, а кратковременная экспрессия рекомбиназы Cre приводит к ее вырезанию [21]. Еще один вариант – использование системы из $\gamma\delta$ транспозона. Плазмиду, содержащую кассету устойчивости к канамицину, фланкированную двумя сайтами *ges*, использовали для получения немаркированных делеций в *M. smegmatis* и БЦЖ. Экспрессия в мутантных штаммах гена резольвазы $\gamma\delta$ транспозона (*tnpR*) приводила к эффективному вырезанию гена устойчивости, фланкированного *ges*-сайтами [18].

Для удаления генов резистентности можно использовать также систему, основанную на эндогенной рекомбиназе Xer. В этой системе кассету устойчивости к антибиотику окружают *dif*-сайтами, которые могут распознаваться и разрешаться

рекомбиназами XerC и XerD. Такая система не требует введения и последующей элиминации дополнительных эписомных элементов, что делает ее чрезвычайно простой и практичной [22]. Система была оптимизирована и использована для нарушения нескольких генов в разных локусах микобактериального генома, что очень важно при конструировании аттенуированных микобактерий и при изучении синергического действия генов и функций дублирующих генов [23].

Метод двухэтапного аллельного обмена для получения немаркированных мутантов стал классическим инструментом генной инженерии микобактерий (рис. 1б). В рамках этого подхода Parish и соавт. разработали систему p2Nil/pGoal, облегчающую сборку конструкций для гомологичной рекомбинации [28, 29]. Векторы серии p2NIL служат для клонирования плеч гомологии или модификации гена-мишени, векторы серии pGOAL содержат маркерные кассеты, например, *lacZ* в сочетании с *sacB* и геном устойчивости к антибиотикам. Вставка маркерной кассеты из pGOAL в p2NIL с модифицированным целевым геном позволяет получить не реплицирующийся в микобактериях суицидный вектор. Получение нокаута/модификации происходит в два этапа: на первом этапе клетки высеваются на среду, содержащую антибиотик и X-gal, чтобы выделить синие колонии, в которых плаزمид включена в геном посредством одного события кроссинговера. Чтобы выделить клоны, в которых произошел второй кроссинговер, клетки высевают на среды без антибиотика, содержащие сахарозу. Так как второй кроссинговер приводит к потере *lacZ* и *sacB*, такие колонии имеют белый цвет и чувствительны к сахарозе. Таким образом получен двойной немаркированный мутант *thyAΔ plcABCD* [24]. Этот метод достаточно широко применяется для решения различных задач, связанных с оценкой роли белков и малых РНК в физиологии микобактерий [25–27].

Суицидный ген *sacB* (*Bacillus subtilis*) широко используется для конструирования как немаркированных, так и меченых мутаций в *M. tuberculosis*. Однако частота спонтанной инактивации *sacB* может находиться практически на том же уровне, что и частота рекомбинации некоторых генов, что усложняет отбор мутантов. Использование двойной контрелекции (*sacB* с геном *Escherichia coli galK*) позволило добиться практически 100%-ной эффективности селекции на микобактериях [28]. Этот принцип использован в оптимизированных суицидных векторах (серия pKO), которые являются частью единой платформы клонирования для генетических манипуляций с микобактериями [10].

Увеличить вероятность прохождения гомологичной рекомбинации можно с использованием реплицирующихся векторов, однако их труднее

удалить. Плазмиды, несущие термочувствительный ориджин репликации, способны реплицироваться при перmissive температуре (30–32°C), но быстро утрачиваются при повышении температуры (39–42°C). Плаزمид для проведения гомологичной рекомбинации также должна содержать контрелективный маркер, например *sacB*. Недостатком этого метода является низкая скорость роста при перmissive температуре [8].

Предложено также использовать систему из двух реплицирующихся плазмид на основе pAL5000, одна из которых содержит *repA* (праймаза), а вторая – *repB* (ДНК-связывающий белок). Эти гены комплементируют друг друга в *trans*-положении и обеспечивают репликацию плазмид [29]. При снятии давления антибиотиком одна или обе плазмиды теряются, а поддержание репликации становится невозможным. Такой подход позволяет продлить время, за которое может произойти обмен аллелями.

Метод специализированной трансдукции позволяет добиться практически 100%-ной эффективности доставки ДНК в клетки. Сборка вектора осуществляется из двух компонентов: космидного вектора, содержащего последовательность для обмена аллелей, и условно реплицирующегося челночного фазмидного вектора – производного фага TM4 с широким кругом хозяев [30]. Микобактериофаги наращивают в *M. smegmatis* при перmissive температуре (30°C), обеспечивающей репликацию фага. Далее следует трансдукция представляющего интерес штамма микобактерий и культивирование при рестриктивной температуре (37°C), ингибирующей репликацию фага. Мутантный аллель содержит ген резистентности, фланкированный сайтами узнавания резольвазы (*tnpR*), временная экспрессия которой приводит к удалению маркера. Метод успешно применен на БЦЖ [31] и *M. tuberculosis* [32]. В дальнейшем эта методика была улучшена и проверена путем создания большого числа целевых единичных или множественных делеционных замен [33, 34].

Использование белков рекомбинации фагов, таких как Exo, Beta и Gam или RecE и RecT, способствует увеличению частоты гомологичной рекомбинации и позволяет использовать более короткие плечи гомологии. Установлено, что продукты генов *gp60* и *gp61* микобактериофага Che9c являются гомологами RecE и RecT и обладают экзонуклеазной и ДНК-связывающей активностью. На их основе создана плаزمид pJV53 для проведения гомологичной рекомбинации в клетках микобактерий. Рекомбинация может происходить при длине плеч гомологии от 50 п.н., но более эффективна, если их длина превышает 500 п.н. Эта система не только упрощает конструирование мутантов в *M. smegmatis*, но и позволяет преодолеть влияние нелегитимной рекомбинации в

M. tuberculosis [35]. Введение в плазмиду pJV53 гена зеленого флуоресцентного белка (*gfp*) облегчает верификацию потери плазмиды. Применение кассеты резистентности к гиромоцину с сайтами *dif* позволяет использовать эту систему для последовательной делеции нескольких генов *M. smegmatis* [36]. Для конструирования немаркированных нокаутов предложено использовать также трехплазмидную систему. В этой системе хелперная плазида содержит термочувствительный ориджин и суицидный ген *sacB* [37]. Плазмиду pYS2 используют для конструирования мутантного аллеля, в который вводят кассету, кодирующую гены устойчивости к гиромоцину и зеленого флуоресцентного белка, окруженные сайтами *loxP*. Из плазмиды получают линейный субстрат, которым трансформируют клетки. Плазида pYS1, производная pJV53, используется для доставки генов *gp60* и *gp61* под индуцибельным промотором. Она также содержит контрольный маркер *sacB*, термочувствительный ориджин репликации и ген устойчивости к канамицину. После проведения рекомбинации клетки трансформируют третьей плазмидой pML2714 для экспрессии рекомбиназы Cre и вырезания кассеты, в результате чего мутантные клоны теряют способность к флуоресценции и устойчивость к гиромоцину.

На основе рекомбиназы фага Che9c разработана система для введения точечных мутаций в геномы микобактерий с использованием оцДНК. Опосредованная *gp61* рекомбинация была достаточно эффективной, чтобы можно было вносить замены одного основания без необходимости прямого отбора; при этом мутантные штаммы идентифицировали с помощью ПЦР. Однако трудоемкий скрининг целевых клонов ограничивает использование этой системы [38].

Таким образом, методы гомологичной рекомбинации успешно применяются для генетического редактирования в микобактериях. Разработаны подходы, совмещающие гомологичную рекомбинацию для обмена аллелей и сайт-специфическую рекомбинацию для последующего удаления генов резистентности, что дает возможность получать простые и эффективные системы редактирования, в том числе с использованием специализированной трансдукции. Применение рекомбинационной инженерии с белками RecE и RecT фага Che9c многократно увеличивает эффективность системы.

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКОБАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАЗ МИКОБАКТЕРИОФАГОВ

Сайт-специфичная рекомбинация — тип генетической рекомбинации, при которой обмен цепей ДНК происходит между определенными последовательностями. В отличие от системы гомо-

логичной рекомбинации такие специфичные сегменты ДНК не имеют протяженных гомологичных участков. Рекомбинацию осуществляет фермент рекомбиназа, которая распознает специфичную последовательность и, связываясь с ней, образует синаптический комплекс, который, в свою очередь, катализирует расщепление хромосомной ДНК с последующими перестройкой и лигированием расщепленных концов [39].

В результате сайт-специфичной рекомбинации во многих случаях происходит интеграция одной молекулы ДНК в другую, а не обмен генетической информации между двумя молекулами.

У бактериофагов рекомбиназа может катализировать обратную реакцию удаления интегрированной последовательности. Многие умеренные бактериофаги, образующие стабильные лизогены, делают это с помощью сайт-специфичной рекомбинации. Одним системам рекомбинации достаточно только рекомбиназы, другим же требуются дополнительные хозяйские факторы.

Способность микобактериофагов стабильно интегрироваться в геном хозяина посредством сайт-специфичной рекомбинации изучали многие научные группы [40–45]. Наиболее хорошо изучены фаги L5, Ms6, Vxb1 и фRv1 микобактерий, о механизме интеграции которых речь будет идти дальше. Изучен также интегративный элемент pSAM2 микобактерий, первоначально идентифицированный у *Streptomyces*.

Наиболее характерным микобактериофагом является умеренный фаг L5, который инфицирует как быстрорастущие, так и медленно растущие виды микобактерий с образованием стабильных лизогенов [45]. Лизогены несут встроенный в определенное место хромосомы профаг L5, который вырезается во время литической фазы. События как интеграции, так и эксцизии катализируются кодируемой фагом интегразой Int и нуждаются в кодируемом хозяином белке mINF (Integration Host Factor). Направленность этих событий рекомбинации определяется вторым кодируемым фагом белком Xis, продуктом гена *36*. Интеграция эффективно протекает в отсутствие Xis в отличие от эксцизии, которая зависит от этого белка [46].

Сайт-специфичная рекомбинация происходит посредством взаимодействия фагового сайта (*attP*) с сайтом прикрепления на бактериальной хромосоме (*attB*). Реакция интеграции воспроизведена *in vitro*; показано, что для нее требуются белки mINF и Int [41, 47]. Сверхспирализация последовательностей *attP* или *attB* может стимулировать интегративную рекомбинацию, но не относится к абсолютно необходимым [48].

Минимальные размеры функциональных сайтов *attP* и *attB* составляют примерно 240 и 29 п.н. соответственно. Последовательность *attP* содержит 43 п.н., общих для двух сайтов, в которых

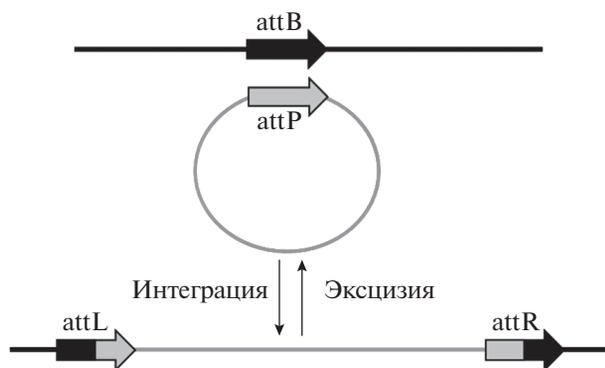


Рис. 2. Общая схема сайт-специфической рекомбинации.

происходит обмен цепями, и рекомбинация приводит к образованию интегрированного профага, ограниченного левым (*attL*) и правым (*attR*) сайтами (рис. 2) [49]. Различие в одном нуклеотиде сайта *attB* у быстрорастущих и медленно растущих микобактерий не влияет существенно на способность микобактериофага L5 эффективно инфицировать обе группы микобактерий [45].

Бактериофаг L5 встраивается вблизи 3'-конца гена *tRNK^{Gly}*, не изменяя его последовательности. С помощью футпринтинга ДНКазы I выявлена необычно длинная область длиной 413 п.н., служащая *attP*-сайтом интегразы L5. В ходе дальнейшего делеционного анализа внутри *attP*-сайта картирован фрагмент длиной 252 п.н., достаточный для эффективной интеграции фага [49].

Систему фага L5 впервые использовали при получении новых рекомбинантных штаммов БЦЖ [43]. Путем замены микобактериального ориджина репликации (*oriM*) в челночном векторе pMV261 на сегмент ДНК, несущий последовательность сайта *attP* и ген интегразы (*Int*) из микобактериофага L5, сконструирован способный к интеграции вектор pMV361. Поскольку отсутствует фаговый белок *Xis*, интегрированный вектор стабильно поддерживается даже без дальнейшего давления антибиотиков.

Геномы микобактериофагов *Vxb1* и L5 имеют сходную организацию [42]. С помощью сериновой интегразы фаг *Vxb1* встраивается в функциональный ген *groEL1* [45]. Микобактерии имеют два гена *groEL*, обладающие высоким уровнем сходства на уровне нуклеотидов (70%), но так как интеграция требует специфичности последовательности, *Vxb1* встраивается только в *groEL1*. При этом сериновые интегразы, в отличие от многих других сайт-специфичных рекомбиназ, не обладают сильной специфичностью к структуре молекул ДНК-субстрата; они рекомбинируют участки в одной и той же молекуле ДНК (в ориентации либо голова к голове, либо голова к хвосту)

или в разных молекулах, а сами молекулы могут быть сверхскрученными, линейными или даже двухцепочечными [50].

В отличие от сайтов тирозиновых интеграз, сайты *attP* и *attB* сериновых интеграз короткие, примерно 50 и 40 п.н. соответственно. Различается также механизм обмена цепями ДНК — тирозиновые интегразы делают одноцепочечные разрывы в ДНК и заменяют одну цепь каждого сайта с образованием промежуточной структуры, подобной соединению Холлидея [51], тогда как сериновые интегразы вносят двухцепочечные разрывы в ДНК и обмениваются цепями по ротационному механизму [52].

Путем объединения двух молекулярных инструментов — гомологичной рекомбинации и сайт-специфичной интеграции — разработана технология ORBIT (*oligonucleotide-mediated recombineering followed by Vxb1 integrase targeting*) [53, 54]. Система ORBIT реализует встраивание целевых фрагментов ДНК в два этапа. Штамм *M. smegmatis* или *M. tuberculosis*, содержащий плазмиду, которая экспрессирует рекомбиназу *RecT* фага *Che9c* и интегразу фага *Vxb1*, котрансформируют короткой синтетической ДНК и нереплицирующейся плазмидой, содержащей сайт *attB* *Vxb1*, ген устойчивости к антибиотику для отбора трансформантов и целевую последовательность. Дизайн олигонуклеотида осуществляют таким образом, чтобы *attP* фага *Vxb1* (48 н.) был фланкирован 45–70 н., гомологичными целевому участку на хромосоме.

На первом этапе в заданный участок генома микобактерии по механизму гомологичной рекомбинации при участии *Che9c RecT* встраивается олигонуклеотид, несущий акцепторный сайт *attP* интегразы *Vxb1*. На втором этапе интегразы *Vxb1* способствует сайт-специфичной рекомбинации между плазмидой, содержащей *attB*, и сайтом *attP*, полученным из олигонуклеотида на первом этапе. В этой системе последовательность синтетического олигонуклеотида определяет положение сайта вставки, а плаزمида служит донором целевой последовательности.

Так как используемая в данной системе интегразы фага *Vxb1* не зависит от факторов хозяина, возможность применения ORBIT будет зависеть от эффективности первого этапа рекомбинации.

Микобактериофаг *Ms6* образует стабильные лизогены в *M. smegmatis*. Сайт прикрепления *attP* *Ms6* имеет высокое содержание А+Т и содержит многочисленные прямые и инвертированные повторы. Интеграция *Ms6* в геном хозяина опосредуется интегразой *Ms6*, которая направляет интеграцию в 3'-конец генов *tRNK^{Ala}* как быстро-, так и медленно растущих микобактерий. Центральная область *attP* длиной 26 п.н. перекрывает 3'-конец гена

тРНК^{Ala}, консервативного признака обеих групп микобактерий [40].

Геномы *M. tuberculosis* H37Rv и CDC1551 содержат два профагоподобных элемента — ϕ Rv1 и ϕ Rv2. Элемент ϕ Rv2 кодирует тирозиную, а ϕ Rv1 — большую сериновую рекомбиназу [55]. Рекомбинация происходит между предполагаемым сайтом attP и хромосомой хозяина, но сайт attB находится при этом внутри избыточного повторяющегося элемента (REP13E12), представленного в геноме *M. tuberculosis* семью копиями. Интересно, что авирулентные штаммы *M. bovis* BCG не имеют ни ϕ Rv1, ни ϕ Rv2. Хотя не все клинические изоляты *M. tuberculosis* содержат ϕ Rv2, все они, по-видимому, имеют по крайней мере одну копию ϕ Rv1 или ϕ Rv2. Предполагается, что эти родственные элементы могут играть роль в физиологии *M. tuberculosis* [44]. Функциональность ϕ Rv1 подтверждена эффективной трансформацией *M. bovis* BCG нереплицирующейся плазмидой, содержащей ген интегразы и сайт attP (реконструированный из сайтов attL и attR профага). Такие векторы могут использовать четыре из семи сайтов REP13E12, присутствующих в БЦЖ, в качестве сайтов присоединения и могут занимать более одного сайта одновременно [55].

pSAM2 представляет собой интегративный элемент длиной 11 т.п.н., первоначально охарактеризованный у *Streptomyces ambofaciens*. Система рекомбинации pSAM2, включающая интегразу семейства λ [56] и сайты attB/P, похожа на системы, описанные выше. Сайт attB покрывает область от антикодоновой петли до 3'-конца гена тРНК^{Pro} длиной 58 п.н. Сайт attB консервативен у актиномицетов, включая микобактерии [57]. Таким образом, pSAM2 может интегрироваться в различные виды актиномицетов.

Использование сайт-специфичной рекомбинации имеет несколько преимуществ. Во-первых, гены воспроизводимо интегрируются в известное место в геноме микобактерий (или, по крайней мере, в ограниченное число мест). Любые эффекты сайтов интеграции (их влияние на экспрессию генов и биологию бактерий) будут в равной степени применимы к любой вставке. Во-вторых, интегрируется одна копия гена, что снижает количество артефактов, которые могут возникать при использовании многокопийных плазмид. В-третьих, штаммы, содержащие интегративные плазмиды, обычно гораздо более стабильны, чем штаммы с эписомными векторами. Наконец, интегразы микобактериофагов могут обеспечить эффективное встраивание более протяженных фрагментов ДНК, чем при гомологичной рекомбинации.

ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ МИКОБАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМ CRISPR/Cas

CRISPR/Cas — это прокариотические системы, состоящие из коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, и ассоциированных с ними белков. Они обеспечивают адаптивный иммунный ответ против чужеродного наследственного материала [58]. Системы второго класса, содержащие один эффекторный белок CRISPR, способный с помощью crRNA распознавать и гидролизовать ДНК-мишень, используются в технологии редактирования *in vivo* генома различных живых организмов. Наиболее часто применяют системы типа II-A из *Streptococcus pyogenes* и типа V-A из *Francisella novicida* [59, 60]. Система редактирования генома из *S. pyogenes* представлена мультидоменной РНК-зависимой ДНК-эндонуклеазой SpyCas9, специфичность которой определяется направляющей РНК. Направляющая РНК, в свою очередь, содержит участок длиной 20 н., называемый спейсером, который комплементарен ДНК-мишени (протоспейсеру), и структурную часть, распознаваемую эндонуклеазой SpyCas9. Направляющая РНК может состоять из двух РНК: crRNA (CRISPR РНК, кодируется CRISPR-повторами) и tracrRNA (спейсерная РНК, кодируется отдельным геном и необходима для процессинга crRNA и связывания SpyCas9) или одной РНК, полученной путем слияния этих двух РНК (химической направляющей РНК, sgRNA) [61]. Для правильного распознавания ДНК-мишени — протоспейсера, справа от него должен находиться короткий участок PAM (Protospacer Adjacent Motif) с последовательностью 5'-NGG-3'. Присутствие PAM и почти полное соответствие между спейсером направляющей РНК и протоспейсером геномной ДНК активируют ДНКазную активность SpyCas9. SpyCas9 вносит двухцепочечный разрыв в ДНК с тупыми концами, активирующий клеточные механизмы репарации ДНК, в ходе которой и происходит наследуемое изменение последовательности генома [60]. Система типа V-A из *F. novicida* состоит только из двух частей: мультидоменной РНК-зависимой ДНК-эндонуклеазы FnoCas12a (Cpf1) и направляющей РНК, содержащей короткую шпильку, распознаваемую эндонуклеазой, и спейсер длиной 23 н. [62]. Последовательность PAM, узнаваемая эндонуклеазой FnoCas12a, представляет собой консенсус 5'-VTTV-3' [63] и, в отличие от системы II-A *S. pyogenes*, он должен находиться слева от протоспейсера ДНК [64]. Кроме того, FnoCas12a, в отличие от SpyCas9, вносит двухцепочечный разрыв ДНК с выступающими концами [64].

Систему CRISPR/Cas *S. pyogenes* первой планировали использовать в качестве гетерологич-

ной системы редактирования генома микобактерий. Однако эндонуклеаза *SpyCas9* оказалась токсичной для микобактерий, особенно при экспрессии ее гена под контролем сильного конститутивного промотора гена *hsp60* [65, 66]. В первых экспериментах удалось адаптировать ее форму без нуклеазной активности (*dSpyCas9*) в целях подавления экспрессии генов [67]. Следует отметить, что ген *dSpyCas9* экспрессировали под контролем тетрациклин-регулируемого промотора, что позволяло избежать токсичного эффекта сверхпродукции *dSpyCas9*. Сообщалось, что нуклеаза *SpyCas9* и ее производные с никазой и без нуклеазных активностей очень токсичны и для грамположительной бактерии *Corynebacterium glutamicum* с GC-богатым геномом [68]. Логично предположить, что токсичность *SpyCas9* в бактериях с GC-богатыми геномами может быть связана с ее неспецифичной ДНК-связывающей активностью из-за GC-богатого РАМ. Это предположение ставится под сомнение данными о том, что *SpyCas9* токсична и после мутирования РАМ-связывающих остатков аргинина [66]. Возможно, токсичность *SpyCas9* в значительной мере опосредована белок-белковыми взаимодействиями. Недавно на клетках млекопитающих показали, что за счет взаимодействия с субъединицей Ku78 ДНК-зависимого киназного комплекса *SpyCas9* дикого типа (*dSpyCas9*) негативно влияет на активность пути репарации ДНК по механизму соединения негомологичных концов (NHEJ) [69], тем самым стимулируя спонтанный мутагенез. Показано, что природные системы CRISPR/Cas9 типа II-A способны подавлять активность NHEJ в клетках бактерий [70]. Эти данные указывают на то, что *SpyCas9* способен взаимодействовать с клеточными белками, тем самым нарушая нормальное протекание клеточных процессов. Тем не менее, не исключен вклад и других факторов в токсичность *SpyCas9*. Так, недавно удалось снизить токсичность системы CRISPR/*SpyCas9* в клетках *C. glutamicum* за счет использования сильного терминатора *grnB* *E. coli* для sgRNA, а также рекомбиназы *RecT* из профага *Rac* в сочетании с донорным фрагментом ДНК в виде олигонуклеотида [71]. По аналогии можно предположить, что терминатор sgRNA *S. pyogenes* не функционирует и в микобактериях и, несмотря на существование трех путей репарации двухцепочечных разрывов ДНК [72], клетки микобактерий не способны эффективно репарировать разрывы ДНК, вызываемые *SpyCas9*.

Токсичность CRISPR/*SpyCas9* способствовала поиску альтернативных систем редактирования микобактерий. В модельной системе с использованием репортерного гена люциферазы *Renilla* исследовали репрессорную активность 11 различных ортологов *SpyCas9* без нуклеазной активности, принадлежащих типам II-A и II-C си-

стем CRISPR/Cas [66]. Экспрессию генов эндонуклеаз Cas контролировали с помощью тетрациклин-регулируемого промотора. В этой системе наиболее эффективным и нетоксичным репрессором оказался *dSt1Cas9* из *S. thermophilus*. Результаты, полученные в модельной системе, подтверждены и в экспериментах по подавлению экспрессии генов микобактерий [66]. Следовательно, *St1Cas9* может служить хорошим кандидатом и в экспериментах по редактированию генома. Однако в недавних исследованиях показано, что конститутивная экспрессия гена *St1Cas9* под контролем промотора гена *hsp60* токсична для *M. smegmatis* [65]. Это означает, что при создании системы редактирования генома микобактерий с участием *St1Cas9* необходимо обеспечить контроль над экспрессией его гена, например, с помощью тетрациклин-регулируемого промотора. Впоследствии это было сделано Meijers и соавт. [73]. Токсичность *St1Cas9* удалось снизить не только благодаря тетрациклин-регулируемому промотору, а также экспрессии единичной копии гена *St1Cas9*, встроенной в геном микобактерий с помощью интегразы фага L5. Оптимальная последовательность РАМ этого редактора 5'-NNAGAAW-3' (где вырожденная позиция W соответствует А или Т) в GC-богатом геноме микобактерий встречается очень редко. Однако известно, что *in vitro* *St1Cas9* в повышенной концентрации способен распознавать РАМ с небольшими отличиями от консенсуса [74]. В соответствии с этими данными показано, что *St1Cas9* способен распознавать субоптимальные РАМ с последовательностью 5'-NNGGAA-3' и 5'-NNAGCAT-3', благодаря чему можно значительно увеличить число потенциальных мишеней в геноме микобактерий *M. marium* и *M. tuberculosis* [73]. С помощью *St1Cas9* успешно выполнен нокдаун целевых генов (эффективность около 50%) и делеции генов (эффективность 22%). В то же время с использованием полногеномного секвенирования показано, что кратковременная индукция экспрессии *St1Cas9* в течение 1 ч практически не приводит к появлению нецелевых мутаций. Однако нежелательные мутации детектируются при более длительной (в течение 10 дней) его экспрессии. Вместе с тем, обнаружено "подтекание" используемого в работе контролируемого промотора, что выражается в появлении отредактированных колоний даже в отсутствие индуктора. В связи с фоновой экспрессией *St1Cas9* и его способностью вызывать при длительной экспрессии нецелевые мутации, предложен способ удаления гена *St1Cas9* из генома микобактерий путем его замены на репортерный ген красного флуоресцентного белка *tdTomato* с помощью гомологичной рекомбинации [73].

Первой системой, использованной собственно в редактировании генома микобактерий, а также *C. glutamicum* [68], стала система типа V-A

из *F. novicida* [75]. Показано, что вносимые Fno-Cas12a двухцепочечные разрывы ДНК летальны для микобактерий. Эти данные подтверждают предположение о том, что пути репарации ДНК микобактерий не могут эффективно справляться с разрывами ДНК, вносимыми гетерологичными системами CRISPR/Cas. Токсичность двухцепочечных разрывов ДНК, вносимых FnoCas12a, в микобактериях преодолена с помощью рекомбиназы микобактериофага Che9c и фрагмента ДНК донора рекомбинации [75]. Чтобы оценить эффективность редактирования генома *M. smegmatis*, в качестве репортера использовали ген зеленого флуоресцентного белка. Эффективность сайт-направленного мутагенеза в *M. smegmatis* составила 80%, а вставка и делеция фрагментов путем рекомбинации с двухцепочечными фрагментами ДНК длиной около 1000 п.н. – 37–75%. При использовании одноцепочечных олигонуклеотидов длиной 59 и 79 н. удалось встроить не более 7 н. и внести делеции длиной до 20 н. с эффективностью 70–80%, а длиной 418 и 1000 п.н. – 17.4 и 8.2% соответственно.

Исследовали также возможность использования 14 белков Cas для редактирования генома микобактерий [65]. Установлено, что экспрессия генов белков Cas *Treponema denticola* (TdCas9), *Neisseria meningitidis* (NmCas9), и *F. tularensis (novicida)* (FnCpf1) под контролем сильного конститутивного промотора *hsp60* не влияет на скорость роста *M. smegmatis*. Обнаружено, что FnCpf1, кодируемый геном, оптимизированным в соответствии с частотой встречаемости кодонов у *M. smegmatis*, токсичен для микобактерий. Предположили, что высокая экспрессия оптимизированных генов приводит к накоплению белков Cas, что повышает частоту вызываемых ими неспецифических одноцепочечных разрывов ДНК до критического уровня [75]. По-видимому, мРНК гена *FnCpf1_cg*, оптимизированного для экспрессии в *C. glutamicum*, транслируется с относительно невысокой скоростью, не позволяя тем самым белку FnCpf1_cg накапливаться в опасных количествах. Из трех нетоксичных в микобактериях белков Cas только FnCpf1_cg проявлял высокую активность с различными направляющими РНК и обеспечивал эффективность редактирования генома микобактерий вплоть до 70%. Следует отметить, что в этой работе [65] редактирование генома микобактерий осуществлялось за счет НHEJ-пути, а не за счет гомологичной рекомбинации, как в рассмотренной выше работе [75]. Поскольку мишенями служили гены известного НHEJ-пути (*ku*, *ligD*), то можно предположить, что репарация двухцепочечных разрывов проходила с участием других известных альтернативных путей [72].

Инструментарий геномной инженерии микобактерий с помощью систем CRISPR/Cas недавно пополнился редакторами оснований. Так,

Ding и соавт. создали двухплазмидную систему MtbCBE, позволяющую эффективно вносить изменения в геном *M. tuberculosis* с помощью цитидинового редактора [76]. Одна из плазмид этой системы кодирует белковые ингибиторы RecA- и NucS-зависимых путей репарации ДНК, а вторая плаزمида кодирует никазу nCas9_{Sth1} из *S. thermophilus*, соединенную с цитидиновой дезаминазой APOBEC1 и UGI – ингибитором урацил-ДНК-гликозилазы. В ходе работы установили, что помимо урацил-ДНК-гликозилаз, в репарации дезаминированных оснований участвуют пути гомологичной рекомбинации (ключевой белок RecA) и репарации неправильно спаренных оснований ДНК (один из ключевых белков нуклеаза NucS), которые значительно снижают степень редактирования генома дезаминазой. Поэтому для повышения эффективности редактирования оснований и создана плазмида, несущая гены ингибиторов этих путей.

Количество потенциальных мишеней полученного редактора ограничено довольно длинным PAM Cas9_{Sth1} и возможностью вносить только замены цитидинов на тимины. Недавно получили новые редакторы оснований, позволяющие вносить замены цитидинов на гуанины [77] и на аденины [78]. В состав этих редакторов введена урацил-ДНК-гликозилаза, выщепляющая дезаминированное основание и создающее апиридинового сайт. Дальнейшая репарация апиридинового сайта ведет преимущественно к трансверсиям C → A или C → G. В настоящее время ведутся работы по адаптации подобных редакторов оснований и к микобактериям, что должно значительно расширить спектр вносимых мутаций.

В ходе биоинформатического анализа в геномах патогенных микобактерий, например *M. tuberculosis* и *M. bovis*, выявлена система CRISPR/Cas10, относящаяся к типу III-A класса I [79, 80]. У штамма *M. tuberculosis* H37Rv система состоит из 9 генов Csm2-6, Cas10, Cas6, Cas1 и Cas2 и двух локусов CRISPR. Нуклеаза Cas6 инициирует созревание crRNA, расщепляя ее предшественник внутри повторов. Образующиеся промежуточные продукты содержат с 5'-конца 8 н. повтора, далее спейсер и полный повтор с 3'-конца [81]. На промежуточных продуктах происходит сборка рибонуклеопротеидного комплекса, включающего белки Csm и нуклеазу Cas10, с вытеснением нуклеазы Cas6. После этого происходит отщепление части повтора с 3'-конца с формированием зрелой crRNA [81]. Следует отметить, что в отличие от систем типа II-A и V-A, рассмотренных ранее, мишенями системы типа III-A может быть как ДНК (в этом случае нуклеазную активность проявляет Cas10), так и РНК (в этом случае нуклеазную активность проявляет Csm3) [82].

Ранние исследования структуры системы, в основном повторов и спейсеров локусов CRISPR, предполагали возможность их использования в качестве средств генотипирования штаммов микобактерий в эпидемиологических исследованиях [83, 84]. Сравнительно недавно началось изучение механизмов функционирования системы CRISPR/Cas10 и регуляции экспрессии ее компонентов у микобактерий [85, 86]. Показано, что система активна против чужеродных элементов ДНК, определены детали биогенеза crRNA [85, 87]. Система CRISPR *M. tuberculosis* активна против ДНК-, а также РНК-мишеней в гетерологичной экспрессионной системе в *E. coli* как в виде очищенных белков, так и *in vivo* [88]. Изучение структуры и механизмов функционирования позволило направить эндогенную систему CRISPR/Cas на редактирование собственного генома *M. tuberculosis* [89], как это сделано ранее в случае, например, эндогенных систем CRISPR/Cas кластридий [90, 91]. С этой целью *M. tuberculosis* трансформировали плазмидой, кодирующей направляющие РНК против целевых участков генома. Используя доноры для рекомбинации с различной структурой, показали возможность инактивации генов и вставки репортерных генов в геном *M. tuberculosis* [89]. Более того, разработан способ подавления экспрессии генов путем нацеливания эндогенной системы CRISPR/Cas10 на мРНК. Ранее установили, что если в 5'-конец спейсера crRNA ввести последовательность 5'-GAAAC-3', которая будет комплементарна мРНК, то в этом случае эффектор Cas10 будет гидролизовать не ДНК, а мРНК [92]. С помощью этого подхода удалось эффективно подавить экспрессию как отдельных генов (*katG*, *dcD* или *esxT*), так и нескольких генов одновременно (*lpqE*, *katG* и *inhA*). Кроме того, выполнены скрининговые исследования, в ходе которых выявлены гены, влияющие на скорость размножения *M. tuberculosis* как в культуре, так и в макрофагах [89]. Таким образом, показана принципиальная возможность использования эндогенных систем CRISPR/Cas микобактерий для редактирования их генома, регуляции экспрессии как отдельных генов, так и групп генов и проведения скрининговых исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы достигнут значительный прогресс в изучении генетики микобактерий, разработаны молекулярные инструменты для эффективных и направленных генетических манипуляций с ними. Рассмотренные в обзоре методы позволяют вносить направленные изменения в геном микобактерий, что востребовано в различных биомедицинских приложениях.

Д.С. Карпов выражает благодарность за финансовую поддержку Министерству науки и выс-

шего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-10-2021-113, ID проекта: RF-193021X0001).

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wei W., Wang F., Fan S., Wei D. (2010) Inactivation and augmentation of the primary 3-ketosteroid- $\Delta 1$ -dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* Nw1B-01: biotransformation of soybean phytosterols to 4-androstene-3,17-dione or 1,4-androstadiene-3,17-dione. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 4578–4582.
2. Sundarsingh J.A.T., Ranjitha J., Rajan A., Shankar V. (2020) Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Public Hlth.* **13**, 1255–1264.
3. Philips J.A., Ernst J.D. (2012) Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **7**, 353–384.
4. Choudhary E., Lunge A., Agarwal N. (2016) Strategies of genome editing in mycobacteria: achievements and challenges. *Tuberculosis.* **98**, 132–138.
5. Zhang Y.J., Ioerger T.R., Huttenhower C., Long J.E., Sasseti C.M., Sacchetti J.C., Rubin E.J. (2012) Global assessment of genomic regions required for growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* **8**, e1002946.
6. Lamrabet O., Drancourt M. (2012) Genetic engineering of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *Tuberculosis.* **92**, 365–376.
7. Borgers K., Vandewalle K., Festjens N., Callewaert N. (2019) A guide to *Mycobacterium* mutagenesis. *FEBS J.* **286**, 3757–3774.
8. Kana B.D., Mizrahi V. (2004) Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* in relation to the discovery of novel drugs and vaccines. *Tuberculosis.* **84**, 63–75.
9. Gopinath K., Warner D.F., Mizrahi V. (2015) Targeted gene knockout and essentiality testing by homologous recombination. In: *Mycobacteria Protocols. Methods in Molecular Biology*. Eds Parish T., Roberts D.M. New York: Humana Press, **1285**, 131–149.
10. Arnold F.M., Hohl M., Remm S., Koliwer-Brandl H., Adenau S., Chusri S., Sander P., Hilbi H., Seeger M.A. (2018) A uniform cloning platform for mycobacterial genetics and protein production. *Sci. Rep.* **8**, 9539.
11. Safi H., Sayers B., Hazbón M.H., Alland D. (2008) Transfer of *embB* codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2027–2034.
12. Brazier B., McShane H. (2020) Towards new TB vaccines. *Semin. Immunopathol.* **42**, 315–331.
13. Bastos R.G., Alzan H.F., Rathinasamy V.A., Cooke B.M., Dellagostin O.A., Barletta R.G., Suarez C.E. (2022)

- Harnessing *Mycobacterium bovis* BCG trained immunity to control human and bovine babesiosis. *Vaccines*. **10**, 1–18.
14. Loxton A.G., Knaul J.K., Grode L., Gutschmidt A., Meller C., Eisele B., Johnstone H., Van Der Spuy G., Maertzdorf J., Kaufmann S.H.E., Hesselting A.C., Walzl G., Cotton M.F. (2017) Safety and immunogenicity of the recombinant *Mycobacterium bovis* BCG vaccine VPM1002 in HIV-unexposed newborn infants in South Africa. *Clin. Vaccine Immunol.* **24**, 1–16.
 15. Grode L., Seiler P., Baumann S., Hess J., Brinkmann V., Eddine A.N., Mann P., Goosmann C., Bandermann S., Smith D., Bancroft G.J., Reyat J.M., Van Soolingen D., Raupach B., Kaufmann S.H.E. (2005) Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J. Clin. Invest.* **115**, 2472–2479.
 16. Arbues A., Aguilo J.I., Gonzalo-Asensio J., Marinova D., Uranga S., Puentes E., Fernandez C., Parra A., Cardona P.J., Vilaplana C., Ausina V., Williams A., Clark S., Malaga W., Guilhot C., Gicquel B., Martin C. (2013) Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine*. **31**, 4867–4873.
 17. Hinds J., Mahenthiralingam E., Kempell K.E., Duncan K., Stokes R.W., Parish T., Stoker N.G. (1999) Enhanced gene replacement in mycobacteria. *Microbiology*. **145**, 519–527.
 18. Malaga W., Perez E., Guilhot C. (2003) Production of unmarked mutations in mycobacteria using site-specific recombination. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**, 261–268.
 19. Stephan J., Stemmer V., Niederweis M. (2004) Consecutive gene deletions in *Mycobacterium smegmatis* using the yeast FLP recombinase. *Gene*. **343**, 181–190.
 20. Song H., Niederweis M. (2007) Functional expression of the FLP recombinase in *Mycobacterium bovis* BCG. *Gene*. **399**, 112–119.
 21. Song H., Wolschendorf F., Niederweis M. (2009) Construction of unmarked deletion mutants. In: *Mycobacteria Protocols. Methods in Molecular Biology*. Eds Parish T., Brown A. Totowa, N.J.: Humana Press, **465**, 279–295.
 22. Cascioferro A., Boldrin F., Serafini A., Proveddi R., Palù G., Manganello R. (2010) Xer site-specific recombination, an efficient tool to introduce unmarked deletions into mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5312–5316.
 23. Yang F., Tan Y., Liu J., Liu T., Wang B., Cao Y., Qu Y., Lithgow T., Tan S., Zhang T. (2014) Efficient construction of unmarked recombinant mycobacteria using an improved system. *J. Microbiol. Methods*. **103**, 29–36.
 24. Parish T., Stoker N.G. (2000) Use of flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement. *Microbiology*. **146**, 1969–1975.
 25. Brown A.C. (2021) Gene switching and essentiality testing. In: *Mycobacteria Protocols. Methods in Molecular Biology*. Eds Parish T., Kumar A. New York: Humana Press, **2314**, 285–299.
 26. Onwueme K.C., Ferreras J.A., Buglino J., Lima C.D., Quadri L.E.N. (2004) Mycobacterial polyketide-associated proteins are acyltransferases: proof of principle with *Mycobacterium tuberculosis* PapA5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 4608–4613.
 27. Grigorov A., Bychenko O., Salina E.G., Skvortsova Y., Mazurova A., Skvortsov T., Kaprelyants A., Azhikina T. (2021) Small rna f6 provides *Mycobacterium smegmatis* entry into dormancy. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(21), 11536.
 28. Barkan D., Stallings C.L., Glickman M.S. (2011) An improved counterselectable marker system for mycobacterial recombination using galK and 2-deoxy-galactose. *Gene*. **470**, 31–36.
 29. Pashley C.A., Parish T., McAdam R.A., Duncan K., Stoker N.G. (2003) Gene replacement in mycobacteria by using incompatible plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 517–523.
 30. Bardarov S., Bardarov S., Pavelka M.S., Sambandamurthy V., Larsen M., Tufariello J.A., Chan J., Hatfull G., Jacobs W.R. (2002) Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology*. **148**, 3007–3017.
 31. Ang M.L.T., Siti Z.Z.R., Shui G., Dianišková P., Madacki J., Lin W., Koh V.H.Q., Gomez J.M.M., Sudarkodi S., Bendt A., Wenk M., Mikušová K., Korduláková J., Pethe K., Alonso S. (2014) An ethA-ethR-deficient *Mycobacterium bovis* BCG mutant displays increased adherence to mammalian cells and greater persistence *in vivo*, which correlate with altered mycolic acid composition. *Infect. Immun.* **82**, 1850–1859.
 32. Bourai N., Jacobs W.R., Narayanan S. (2012) Deletion and overexpression studies on DacB2, a putative low molecular mass penicillin binding protein from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microb. Pathog.* **52**, 109–116.
 33. Jain P., Hsu T., Arai M., Biermann K., Thaler D.S., Nguyen A., González P.A., Tufariello J.M., Kriakov J., Chen B., Larsen M.H., Jacobs W.R. (2014) Specialized transduction designed for precise high-throughput unmarked deletions in *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio*. **5**(3), e01245-14.
 34. Alonso M.N., Malaga W., Mc Neil M., Jackson M., Romano M.I., Guilhot C., Santangelo M.P. (2020) Efficient method for targeted gene disruption by homologous recombination in *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Res. Microbiol.* **171**, 203–210.
 35. van Kessel J.C., Hatfull G.F. (2007) Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Methods*. **4**, 147–152.
 36. Mao X., Yan M., Zhu H., Guo X., Sun Y. (2016) Efficient and simple generation of multiple unmarked gene deletions in *Mycobacterium smegmatis*. *Sci. Rep.* **14**(6), 22922.
 37. Shenkerman Y., Elharar Y., Vishkautzan M., Gur E. (2014) Efficient and simple generation of unmarked gene deletions in *Mycobacterium smegmatis*. *Gene*. **533**, 374–378.
 38. van Kessel J.C., Hatfull G.F. (2008) Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets. *Mol. Microbiol.* **67**, 1094–1107.

39. Niranjala Muttucumaru D.G., Parish T. (2004) The molecular biology of recombination in mycobacteria: what do we know and how can we use it? *Curr. Issues Mol. Biol.* **6**(2), 145–157.
40. Freitas-Vieira A., Anes E., van Kessel Moniz-Pereira J. (1998) The site-specific recombination locus of mycobacteriophage Ms6 determines DNA integration at the tRNA(Ala) gene of *Mycobacterium spp.* *Microbiology.* **144**, 3397–3406.
41. Pedulla M.L., Lee M.H., Lever D.C., Hatfull G.F. (1996) A novel host factor for integration of mycobacteriophage L5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**(26), 15411–15416.
42. Mediavilla J., Jain S., Kriakov J., Ford M.E., Duda R.L., Jacobs W.R., Hendrix R.W., Hatfull G.F. (2002) Genome organization and characterization of mycobacteriophage Bxb1. *Mol. Microbiol.* **38**, 955–970.
43. Springer B., Sander P., Sedlacek L., Ellrott K., Böttger E.C. (2001) Instability and site-specific excision of integration-proficient mycobacteriophage L5 plasmids: development of stably maintained integrative vectors. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 669–675.
44. Bibb L.A., Hatfull G.F. (2002) Integration and excision of the *Mycobacterium tuberculosis* prophage-like element, ϕ Rv1. *Mol. Microbiol.* **45**, 1515–1526.
45. Kim A.I., Ghosh P., Aaron M.A., Bibb L.A., Jain S., Hatfull G.F. (2003) Mycobacteriophage Bxb1 integrates into the *Mycobacterium smegmatis* *groEL1* gene. *Mol. Microbiol.* **50**, 463–473.
46. Lewis J.A., Hatfull G.F. (2003) Control of directionality in L5 integrase-mediated site-specific recombination. *J. Mol. Biol.* **326**, 805–821.
47. Lee M.H., Hatfull G.F. (1993) Mycobacteriophage L5 integrase-mediated site-specific integration *in vitro*. *J. Bacteriol.* **175**(21), 6836–6841.
48. Peña C.E.A., Kahlenberg J.M., Hatfull G.F. (1998) The role of supercoiling in mycobacteriophage L5 integrative recombination. *Nucl. Acids Res.* **26**, 4012–4018.
49. Peña C.E.A., Lee M.H., Pedulla M.L., Hatfull G.F. (1997) Characterization of the mycobacteriophage L5 attachment site, attP. *J. Mol. Biol.* **266**(1), 76–92.
50. Stark W.M. (2017) Making serine integrases work for us. *Curr. Opin. Microbiol.* **38**, 130–136.
51. Landy A. (2015) The λ integrase site-specific recombination pathway. *Microbiol. Spectr.* **3**(2), MDNA3-0051-2014.
52. Stark W.M. (2014) The serine recombinases. *Microbiol. Spectr.* **2**(6), MDNA3-0046-2014.
53. Murphy K.C., Nelson S.J., Nambi S., Papavinasandaram K., Baer C.E., Sasseti C.M. (2018) Orbit: a new paradigm for genetic engineering of mycobacterial chromosomes. *MBio.* **9**(6), e01467-18.
54. Murphy K.C. (2021) Oligo-mediated recombineering and its use for making SNPs, knockouts, insertions, and fusions in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Mycobacteria Protocols. Methods in Molecular Biology*, Eds Parish T., Kumar A. New York: Humana Press, **2314**, 301–321.
55. Bibb L.A., Hancox M.I., Hatfull G.F. (2005) Integration and excision by the large serine recombinase ϕ Rv1 integrase. *Mol. Microbiol.* **55**, 1896–1910.
56. Seoane A., Navas J., García Lobo J.M. (1997) Targets for pSAM2 integrase-mediated site-specific integration in the *Mycobacterium smegmatis* chromosome. *Microbiology.* **143**, 3375–3380.
57. Mazodier P., Thompson C., Boccard F. (1990) The chromosomal integration site of the *Streptomyces* element pSAM2 overlaps a putative tRNA gene conserved among actinomycetes. *Mol. Gen. Genet.* **222**(2–3), 431–434.
58. Marraffini L.A. (2015) CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature.* **526**, 1–13.
59. Bayat H., Modarressi M.H., Rahimpour A. (2018) The conspicuity of CRISPR-Cpf1 system as a significant breakthrough in genome editing. *Curr. Microbiol.* **75**(1), 107–115.
60. Roy B., Zhao J., Yang C., Luo W., Xiong T., Li Y., Fang X., Gao G., Singh C.O., Madsen L., Zhou Y., Kristiansen K. (2018) CRISPR/Cascade 9-mediated genome editing—challenges and opportunities. *Front. Genet.* **9**, 240.
61. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* **337**, 816–821.
62. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* **163**(3), 759–771.
63. Leenay R.T., Maksimchuk K.R., Slotkowski R.A., Agrawal R.N., Goma A.A., Briner A.E., Barrangou R., Beisel C.L. (2016) Identifying and visualizing functional PAM diversity across CRISPR-Cas systems. *Mol. Cell.* **62**(1), 137–147.
64. Swarts D.C., Jinek M. (2018) Cas9 versus Cas12a/Cpf1: structure–function comparisons and implications for genome editing. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* **9**(5), e1481.
65. Sun B., Yang J., Ye R.D., Jiang Y., Chen D., Yang S. (2018) A CRISPR-Cpf1-assisted non-homologous end joining genome editing system of *Mycobacterium smegmatis*. *Biotechnol. J.* **13**(9), e1700588.
66. Rock J.M., Hopkins F.F., Chavez A., Diallo M., Chase M.R., Gerrick E.R., Pritchard J.R., Church G.M., Rubin E.J., Sasseti C.M., Schnappinger D., Sarah M.F. (2017) Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat. Microbiol.* **2**, 16274.
67. Singh A.K., Carette X., Potluri L.P., Sharp J.D., Xu R.F., Prisc S., Husson R.N. (2016) Investigating essential gene function in *Mycobacterium tuberculosis* using an efficient CRISPR interference system. *Nucl. Acids Res.* **44**, e143.
68. Jiang Y., Qian F., Yang J., Liu Y., Dong F., Xu C., Sun B., Chen B., Xu X., Li Y., Wang R., Yang S. (2017)

- CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. *Nat. Commun.* **8**, 15179
69. Xu S., Kim J., Tang Q., Chen Q., Liu J., Xu Y., Fu X. (2020) Cas9 is a genome mutator by directly disrupting DNA-PK dependent DNA repair pathway. *Protein Cell.* **11**(5), 352–365.
 70. Bernheim A., Calvo-Villamanan A., Basier C., Cui L., Rocha E.P.C., Touchon M., Bikard D. (2017) Inhibition of NHEJ repair by type II-A CRISPR-Cas systems in bacteria. *Nat. Commun.* **8**(1), 2094.
 71. Liu J., Wang Y., Lu Y., Zheng P., Sun J., Ma Y. (2017) Development of a CRISPR/Cas9 genome editing toolbox for *Corynebacterium glutamicum*. *Microb. Cell Fact.* **16**, 205.
 72. Singh A. (2017) Guardians of the mycobacterial genome: a review on DNA repair systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* **163**, 1740–1758.
 73. Meijers A.S., Troost R., Ummels R., Maaskant J., Speer A., Nejentsev S., Bitter W., Kuijl C.P. (2020) Efficient genome editing in pathogenic mycobacteria using *Streptococcus thermophilus* CRISPR1-Cas9. *Tuberculosis* (Edinb.). **124**, 101983.
 74. Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A., Cigan M., Siksnys V. (2015) Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements. *Genome Biol.* **16**, 253.
 75. Yan M.-Y., Yan H.-Q., Ren G.-X., Zhao J.-P., Guo X.-P., Sun Y.-C. (2017) CRISPR-Cas12a-assisted recombining in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e00947–00917.
 76. Ding X.Y., Li S.S., Geng Y.M., Yan M.Y., Li G.B., Zhang G.L., Sun Y.C. (2021) Programmable base editing in *Mycobacterium tuberculosis* using an engineered CRISPR RNA-guided cytidine deaminase. *Front. Genome Ed.* **3**, 734436.
 77. Kurt I.C., Zhou R., Iyer S., Garcia S.P., Miller B.R., Langner L.M., Grunewald J., Joung J.K. (2021) CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat. Biotechnol.* **39**(1), 41–46.
 78. Zhao D., Li J., Li S., Xin X., Hu M., Price M.A., Rosser S.J., Bi C., Zhang X. (2021) Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat. Biotechnol.* **39**(1), 35–40.
 79. He L., Fan X., Xie J. (2012) Comparative genomic structures of *Mycobacterium* CRISPR-Cas. *J. Cell Biochem.* **113**(7), 2464–2473.
 80. Supply P., Marceau M., Mangenot S., Roche D., Rouanet C., Khanna V., Majlessi L., Criscuolo A., Tap J., Pawlik A., Fiette L., Orgeur M., Fabre M., Parmentier C., Frigui W., Simeone R., Boritsch E.C., Debie A.S., Willery E., Walker D., Quail M.A., Ma L., Bouchier C., Salvignol G., Sayes F., Cascioferro A., Seemann T., Barbe V., Locht C., Gutierrez M.C., Leclerc C., Bentley S.D., Stinear T.P., Brisse S., Medigue C., Parkhill J., Cruveiller S., Brosch R. (2013) Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Genet.* **45**(2), 172–179.
 81. Liu T., Pan S., Li Y., Peng N., She Q. (2018) Type III CRISPR–Cas system: introduction and its application for genetic manipulations. *Curr. Issues Mol. Biol.* **26**, 1–14.
 82. Pyenson N.C., Marraffini L.A. (2017) Type III CRISPR–Cas systems: when DNA cleavage just isn't enough. *Curr. Opin. Microbiol.* **37**, 150–154.
 83. Gomgnimbou M.K., Abadia E., Zhang J., Refregier G., Panaiotov S., Bachiyska E., Sola C. (2012) “Spoligotyping,” a dual-priming oligonucleotide-based direct-hybridization assay for tuberculosis control with a multi-analyte microbead-based hybridization system. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3172–3179.
 84. Botelho A., Canto A., Leao C., Cunha M.V. (2015) Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) analysis of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Methods Mol. Biol.* **1247**, 373–389.
 85. Zhang Y., Yang J., Bai G. (2018) Regulation of the CRISPR-associated genes by Rv2837c (CnpB) via an Orn-like activity in TB complex mycobacteria. *J. Bacteriol.* **200**(8), e00743-17.
 86. Huang Q., Luo H., Liu M., Zeng J., Abdalla A.E., Duan X., Li Q., Xie J. (2016) The effect of *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR-associated Cas2 (Rv2816c) on stress response genes expression, morphology and macrophage survival of *Mycobacterium smegmatis*. *Infect. Genet. Evol.* **40**, 295–301.
 87. Wei W., Zhang S., Fleming J., Chen Y., Li Z., Fan S., Liu Y., Wang W., Wang T., Liu Y., Ren B., Wang M., Jiao J., Chen Y., Zhou Y., Zhou Y., Gu S., Zhang X., Wan L., Chen T., Zhou L., Chen Y., Zhang X.E., Li C., Zhang H., Bi L. (2019) *Mycobacterium tuberculosis* type III-A CRISPR/Cas system crRNA and its maturation have atypical features. *FASEB J.* **33**(1), 1496–1509.
 88. Gruschow S., Athukoralage J.S., Graham S., Hoogboom T., White M.F. (2019) Cyclic oligoadenylate signalling mediates *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR defence. *Nucl. Acids Res.* **47**(17), 9259–9270.
 89. Rahman K., Jamal M., Chen X., Zhou W., Yang B., Zou Y., Xu W., Lei Y., Wu C., Cao X., Tyagi R., Ahsan Naeem M., Lin D., Habib Z., Peng N., Fu Z.F., Cao G. (2021) Reprogramming *Mycobacterium tuberculosis* CRISPR system for gene editing and genome-wide RNA interference screening. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* S1672-0229(21)00249-7. <https://doi.org/10.1101/2020.03.09.983494>
 90. Pyne M.E., Bruder M.R., Moo-Young M., Chung D.A., Chou C.P. (2016) Harnessing heterologous and endogenous CRISPR–Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*. *Sci. Rep.* **6**, 25666.
 91. Zhang J., Zong W., Hong W., Zhang Z.T., Wang Y. (2018) Exploiting endogenous CRISPR–Cas system for multiplex genome editing in *Clostridium tyrobutyricum* and engineer the strain for high-level butanol production. *Metab. Eng.* **47**, 49–59.
 92. You L., Ma J., Wang J., Artamonova D., Wang M., Liu L., Xiang H., Severinov K., Zhang X., Wang Y. (2019) Structure studies of the CRISPR–Csm complex reveal mechanism of co-transcriptional interference. *Cell.* **176**(1–2), 239–253.

Genetic Engineering of Mycobacteria

D. K. Armianinova^{1, *}, D. S. Karpov², M. S. Kotliarova¹, and A. V. Goncharenko¹

¹Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: dasha.arm@yandex.ru

Genetic tools for targeted modification of the genome of mycobacteria contribute to the development of our understanding of the physiology and virulence mechanisms of this group of microorganisms. Human and animal pathogens, such as the causative agents of tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis* complex and leprosy – *Mycobacterium leprae* are of particular importance. Genetic research opens up novel opportunities for the identification and validation of new targets for antibacterial drugs and the development of new better vaccines. Despite the difficulties of working with mycobacteria, which were associated with limited opportunities for the transfer of genetic information and the slow growth rate of the most important microorganisms, significant progress has been succeeded in the development of genetic engineering methods. The review considers the main approaches for targeted changes in the mycobacterial genome, such as methods of homologous as well as, and the CRISPR/Cas system.

Keywords: *Mycobacterium* spp., gene editing, homologous recombination, site-specific recombination, CRISPR/Cas

УДК 571.21:579.23

РЕПАРАЦИЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК, ГЕНЕРИРУЕМЫХ CRISPR-Cas9 В *Pseudomonas putida* KT2440[#]**© 2022 г. Н. Шараев^{a, §}, L. Chacon-Machado^{a, c, §}, О. Мушарова^{a, b},
Е. Савицкая^a, К. Северинов^{a, b, *}**^aСколковский институт науки и технологий, Москва, 143028 Россия^bИнститут молекулярной генетики, Москва, 119334 Россия^cDepartment of Microbiology, Cornell University, Ithaca, NY 14850 USA

*e-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Поступила в редакцию 03.05.2022 г.

После доработки 30.05.2022 г.

Принята к публикации 30.05.2022 г.

Pseudomonas putida KT2440 — это метаболически универсальная бактерия со значительными перспективами в качестве основного штамма для производства и переработки сложных органических соединений. В отличие от большинства бактерий, *P. putida* KT2440 кодирует белки Ku и LigD, участвующие в неомологичном соединении концов (NHEJ). Этот путь восстановления двухцепочечных разрывов (DSB) в ДНК обладает мутагенным потенциалом, который может быть использован в сочетании с доступными в настоящее время инструментами редактирования генома, генерирующими программируемые DSB. В этой работе мы исследовали эффект делеции или сверхэкспрессии NHEJ-ассоциированных ферментов *P. putida* KT2440 на мутациях, генерируемых при репарации Cas9-опосредованных DSB, с двойной целью — охарактеризовать NHEJ и изучить, как он функционально взаимодействует с текущим “золотым стандартом” редактирования генов. Результаты нашей работы проливают свет на нематричные механизмы репарации DSB у *P. putida* KT2440. Представленная информация послужит основой для расширения инструментария генной инженерии этого важного микроорганизма.

Ключевые слова: *Pseudomonas putida*, двухцепочечная ДНК, репарация DSB, CRISPR-Cas9

DOI: 10.31857/S0026898422060180

**Repair of Double-Stranded DNA Breaks Generated by CRISPR-Cas9
in *Pseudomonas putida* KT2440****N. Sharaev¹, L. Chacon-Machado^{1, 3}, O. Musharova^{1, 2}, E. Savitskaya¹, and K. Severinov^{1, 2, *}**¹Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Moscow, 143028 Russia²Institute of Molecular Genetics, Moscow, 119334 Russia³Department of Microbiology, Cornell University, Ithaca, NY 14850 USA

*e-mail: severik@waksman.rutgers.edu

Pseudomonas putida KT2440 is a metabolically versatile bacterium with considerable promise as a chassis strain for production and degradation of complex organic compounds. Unlike most bacteria, *P. putida* KT2440 encodes the Ku and LigD proteins involved in Non-Homologous-End-Joining (NHEJ). This pathway of repair of double-strand-breaks (DSBs) in DNA has an intrinsic mutagenic potential that could be exploited in combination with currently available genome editing tools that generate programmable DSBs. Here, we investigated the effect of removal or overproduction of NHEJ-associated *P. putida* KT2440 enzymes on mutations generated upon repair of Cas9-mediated DSBs with the double purpose of characterizing the NHEJ pathway and investigating how it functionally interacts with the current gold standard tool for gene editing. The results of our work shed light on non-templated mechanisms of DSB repair in *P. putida* KT2440, an information that will serve as foundation to expand the gene engineering toolbox for this important microorganism.

Keywords: *Pseudomonas putida*, double-stranded DNA, DSB repair, CRISPR-Cas9[#] Статья подана авторами на английском языке.[§] Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

УДК 577.214

ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ-АРГОНАВТЫ КАК ИНСТРУМЕНТ БИОТЕХНОЛОГИИ

© 2022 г. Е. В. Кропачева^{а, #}, Л. А. Лисицкая^{а, #}, А. А. Агапов^{а, #}, А. А. Мусабилов^а,
А. В. Кульбачинский^а, Д. М. Есюнина^{а, #, *}

^аИнститут молекулярной генетики Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”,
Москва, 123182 Россия

*e-mail: es_dar@inbox.ru

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 20.04.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

Программируемые нуклеазы — важнейший инструмент для манипуляций с генами и геномами прокариот и эукариот. С конца XX века ведется разработка подходов к направленному изменению конкретных участков генома без модификации остальной ДНК. В обзоре кратко рассмотрены достоинства и недостатки основных известных на сегодня генетических редакторов. Основное внимание уделено программируемым нуклеазам из семейства прокариотических белков-Аргонавтов. Эти белки узнают и расщепляют определенные последовательности ДНК с использованием коротких комплементарных молекул-гидов и играют важную роль в защите клеток прокариот от чужеродной ДНК. Белки-Аргонавты уже нашли применение в биотехнологии для направленного расщепления и детекции нуклеиновых кислот и потенциально могут быть использованы для редактирования геномов.

Ключевые слова: программируемые нуклеазы, белки-Аргонавты, направляющая ДНК, биосенсоры, редактирование генома

DOI: 10.31857/S0026898422060131

ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ПРОГРАММИРУЕМЫХ НУКЛЕАЗ

Направленные изменения последовательности ДНК на уровне конкретных генов и регуляторных участков генома имеют ключевое значение как для фундаментальных исследований механизмов работы генома и изучения функций определенных белков, так и для решения прикладных задач — от создания штаммов-продуцентов до лечения генетических заболеваний. Важнейшим инструментом в этих исследованиях служат программируемые нуклеазы — ферменты, которые могут быть направлены в определенное место генома для внесения изменений в последовательность ДНК. Каталитически неактивные варианты программируемых нуклеаз могут использоваться для редактирования эпигенетических меток и регуляции экспрессии генов за счет привлечения в определенные участки генома различных функциональных доменов и для визуализации целевых участков генома в клетках. Программируемые нуклеазы также применяют для идентификации целевых последовательностей в

биологических образцах и для расщепления нуклеиновых кислот *in vitro*.

К настоящему времени известно несколько групп программируемых нуклеаз природного и синтетического происхождения, различающихся по механизму распознавания и разрезания ДНК и потенциалу практического применения. Во всех случаях внесение разрывов в целевой участок ДНК может затем приводить к потере функциональности данного гена либо к требуемому изменению его последовательности в ходе репарации. Можно выделить две большие группы таких ферментов: нуклеазы, узнающие сайт расщепления с помощью ДНК-белковых взаимодействий, и нуклеазы, узнающие ДНК посредством связанной короткой комплементарной РНК или ДНК. Хотя исторически ферменты первой группы были найдены и использованы раньше, ферменты второй группы обладают гораздо большей гибкостью в узнавании целевых участков ДНК и именно их используют в качестве основных инструментов редактирования генома в последние годы. Сравнение разных классов программируемых нуклеаз приведено на рис. 1.

[#] Эти авторы внесли равный вклад.

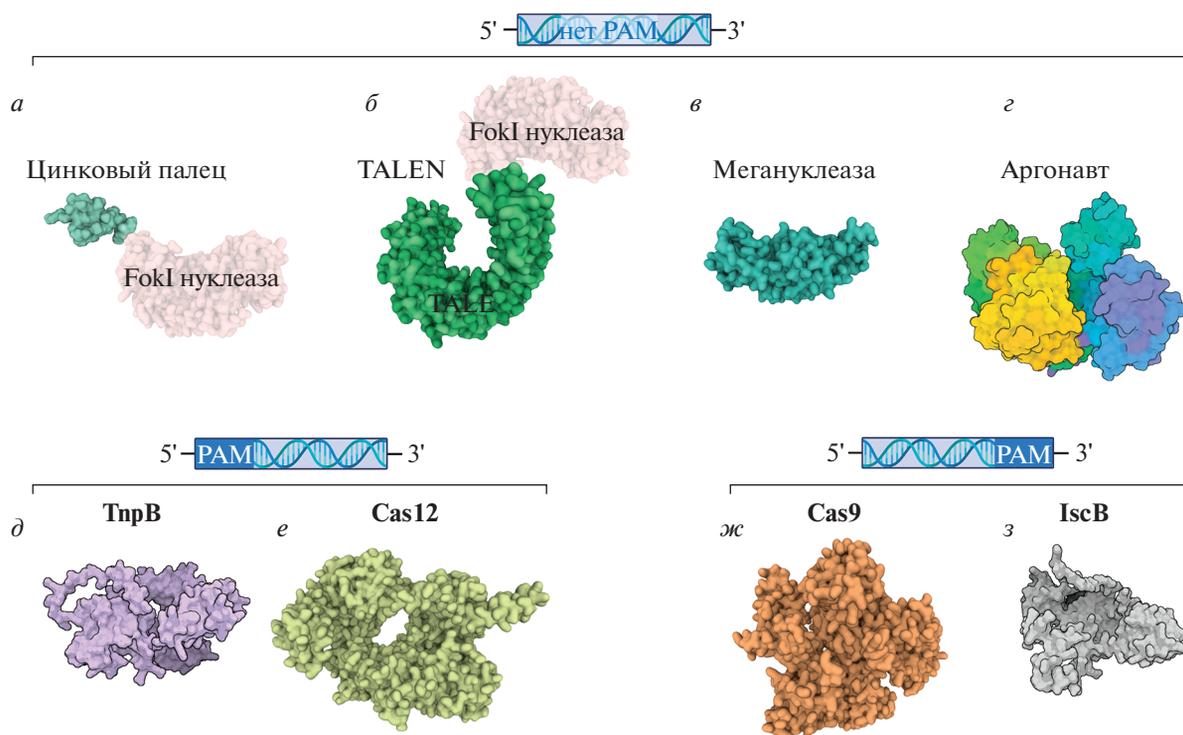


Рис. 1. Разнообразие программируемых нуклеаз. (а–г) – Эндонуклеазы, не требующие для каталитической активности наличия последовательности PAM (protospacer adjacent motif) в мишени; д, е – эндонуклеазы, требующие наличия PAM в 5'-области от сайта узнавания; ж, з – эндонуклеазы, требующие наличия PAM в 3'-области от сайта узнавания. а – химерная эндонуклеаза на основе ДНК-связывающего домена цинкового пальца (PDB ID: 7ZNF) и FokI (PDB ID: 2FOK) (структуры белков объединены для иллюстрации); б – химерная эндонуклеаза на основе ДНК-связывающего домена TALE (PDB ID: 4HPZ) и FokI (PDB ID: 2FOK) (структуры белков объединены для иллюстрации); в – мегануклеаза I-AabMI (PDB ID: 4YIT); г – белок-Аргонавт, может быть РНК- или ДНК-зависимой эндонуклеазой и проявлять каталитическую активность в отношении РНК или ДНК (TtAgo, PDB ID: 4NCB); д – РНК-зависимая ДНК-эндонуклеаза TnpB (структура TnpB ISDга2 предсказана с использованием алгоритма AlphaFold2 [1]); е – РНК-зависимая ДНК-эндонуклеаза Cas12 (PDB ID: 7EU9) [2]; ж – РНК-зависимая ДНК-эндонуклеаза Cas9 (PDB ID: 6M0X) [3]; з – РНК-зависимая ДНК-эндонуклеаза IscB (структура предсказана с использованием алгоритма AlphaFold2 [1]).

Мегануклеазы

Мегануклеазы распознают длинные (от 12 до 44 п.н.) участки ДНК [4, 5]. Встречающиеся в природе мегануклеазы относятся к группе хоуминг-эндонуклеаз (homing endonucleases), обеспечивающих перенос мобильных элементов. Мегануклеазы расщепляют цепи ДНК в области четырех центральных нуклеотидов в сайте узнавания с образованием двухцепочечного разрыва с 3'-концевыми 4-нуклеотидными выступающими концами [6, 7]. Небольшой размер этих белков с длинным ДНК-узнающим сайтом привлекает к ним внимание как к инструментам для манипуляций с геномом. Ограничение заключается в том, что сайт узнавания должен быть искусственно внесен в геном. К началу 2000-х было открыто и описано несколько сотен эндонуклеаз с различными сайтами узнавания [5], а также созданы ферменты с измененной специфичностью [8–10].

Химерные нуклеазы

Идея создания химерных нуклеаз путем соединения в одной белковой молекуле нуклеазного домена одного белка и ДНК-распознающего домена другого белка была высказана в 1994 году Kim & Chandrasegaran [11]. Исследователи объединили нуклеазный домен эндонуклеазы рестрикции *Flavobacterium okeanoikoites* FokI, не обладающий специфичностью к определенной последовательности ДНК, и гомеодомен регуляторного белка Ultrabithorax дрозофилы, распознающий последовательность длиной 9 нуклеотидов. Авторы также предложили варианты ДНК-распознающих доменов из других белков, которые позже, действительно, были использованы для создания новых химерных нуклеаз.

SGN

SGN (structure-guided endonuclease) – это специфичная к структурам эндонуклеаза. Нуклеазы

могут быть направлены к определенному месту в геноме с помощью распознавания определенных структур в ДНК. Примером может быть нуклеаза, состоящая из flap-эндонуклеазы (flap endonuclease-1) FEN1 археи *Archaeoglobus fulgidus* и нуклеазного домена FokI [12, 13]. Для внесения разрыва в нужное место в ДНК используют ДНК-гиды, комплементарные необходимому участку за исключением одного 3'-концевого нуклеотида. Этот нуклеотид распознается FEN1 в составе SGN, далее FokI вносит разрыв в ДНК на расстоянии 9–10 нуклеотидов от 3'-конца гида. Однако SGN может узнавать и 3'-выступающие одностранные фрагменты, возникающие при репарации и репликации. Это приводит к значительным нецелевым перестройкам генома [12, 13]. Наряду с невысокой эффективностью это стало весомым ограничением развития технологии SGN.

Цинковые пальцы

Впервые домен типа “цинковый палец” (ZF, zinc finger) был описан J. Miller и соавт. в 1985 году [14] при изучении транскрипционного фактора TFIIIA из ооцитов лягушки. TFIIIA представляет собой 9 повторяющихся мотивов длиной 30 аминокислотных остатков (а.о.), содержащих два консервативных гистидина и два цистеина, на вершине каждого “пальца” сконцентрированы полярные и основные аминокислоты, которые отвечают за взаимодействие с нуклеиновыми кислотами [14, 15]. Один цинковый палец отвечает за узнавание 3-нуклеотидной последовательности [16, 17]. Первая сайт-специфическая нуклеаза, содержащая цинковые пальцы в качестве ДНК-распознающего домена и нуклеазный домен FokI (ZFN, zinc finger nuclease), получена и описана Y. Kim и соавт. в 1996 году [18]. Распознавание отдельных нуклеотидов с помощью отдельных аминокислот внутри цинкового пальца и способность последних работать как независимые модули при узнавании протяженных последовательностей ДНК позволяют использовать эти домены для программирования искусственных белковых инструментов, предназначенных для работы с нуклеиновыми кислотами. В ходе исследований химерных молекул ZFN в клетках дрозофилы и млекопитающих выявлена их высокая цитотоксичность, обусловленная неспецифическим распознаванием и разрезанием ДНК (off-target effect) [16]. Очевидный способ повысить специфичность узнавания мишени с помощью ZFN – увеличить число цинковых пальцев. Однако Y. Shimizu и др. [19], обнаружили, что активность нуклеаз с пятью или шестью цинковыми пальцами гораздо ниже в сравнении с белками с одним таким доменом. Таким образом, создание функциональных нуклеаз с несколькими

цинковыми пальцами представляет собой сложную задачу.

TALEN

TALEN (transcription activator-like effectors nuclease) – это эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции. TALE – большое семейство транскрипционных активаторов, которые относятся к факторам вирулентности фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas*. Еще в 1989 году U. Bonas и др. [20] показали, что они содержат повторяющиеся элементы. Повторы имеют одинаковую последовательность, за исключением аминокислот в позициях 12 и 13 (repeat variable di-residues, RVDs). Именно эта пара аминокислот отвечает за специфическое распознавание единичного нуклеотида в ДНК [21–23]. Модульное строение и специфичность к отдельным нуклеотидам ДНК-распознающих доменов TALE открывает возможность их применения в качестве компонента химерных нуклеаз. Первые химерные нуклеазы на основе TALE (TALEN – TALE nuclease) были сконструированы на основе фрагмента TALE-белка, содержащего повторы, и нуклеазного домена FokI [24].

Cas-нуклеазы

В последние годы наиболее широко в геномном редактировании используют Cas-нуклеазы, которые являются частью CRISPR-Cas-систем адаптивного иммунитета прокариот (от англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами). Системы CRISPR-Cas имеют модульную организацию. Два основных компонента – модуль, ответственный за адаптацию (вставку в CRISPR-кассету новых спейсеров), и эффекторный модуль, ответственный за интерференцию. Модули представлены комплексами белков Cas, гены которых находятся в одном опероне. На основе строения эффекторного модуля выделяют два класса CRISPR-Cas систем. В системах Класса 1 эффекторный модуль представлен многосубъединичным комплексом, в который входит несколько Cas-белков. В системах Класса 2 его функцию выполняет один крупный белок, включающий большое число доменов. Класс 1 включает CRISPR-Cas системы I, III, IV типов, Класс 2 – II, V и VI [25]. Наибольший интерес для практического применения представляют эффекторные модули Класса 2, так как они представлены единой белковой молекулой с нуклеазной активностью.

Наиболее полно изучена нуклеаза Cas9 бактерии *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), представитель II типа CRISPR-Cas систем. Для работы Cas9 необходимы две РНК: crРНК (CRISPR RNA),

содержащая последовательность спейсера, и *tracrRNA* (*trans-activating crRNA*). Cas9, загруженная *crRNA-tracrRNA*, вносит двунитевой разрыв в последовательность, соответствующую спейсеру, в ДНК-мишени. Для удобства практического применения Cas9 в качестве сайт-специфической программируемой нуклеазы *crRNA* и *tracrRNA* объединяют в одну молекулу РНК – *single guide RNA* (*sgRNA*). Cas9 – крупная ДНК-эндонуклеаза (*SpCas9* состоит из 1368 а.о.), вносящая двухцепочечный разрыв с образованием тупого конца внутри участка, узнаваемого *sgRNA*, на расстоянии 3 нуклеотидов от его правого конца. Расщепление ДНК осуществляется двумя нуклеазными доменами. HNH-подобный домен разрезает нить ДНК, комплементарную РНК-гиду (целевая нить). RuvC-подобный домен имеет укладку, подобную РНКазе H, и разрезает противоположную нить (нецелевая цепь) [26]. В начале 2013 года было опубликовано три исследования, в которых показана возможность применения Cas9 в качестве программируемой ДНКазы для внесения изменений в геном в культурах клеток человека [27–29]. Это положило начало использованию нуклеазы Cas9 в науке и биотехнологии.

sgRNA позволяет направлять Cas9 к любой последовательности ДНК, но при условии наличия в ней мотива PAM (*protospacer adjacent motif*, прилегающий к протоспейсеру мотив) справа от узнаваемой последовательности. PAM, распознаваемый *SpCas9*, представляет собой тринуклеотид 5'-NGG-3', где N – любой из четырех нуклеотидов ДНК [30], для разных белков семейства Cas длина и последовательность этого мотива могут отличаться. Для расширения спектра последовательностей, доступных для распознавания Cas9, были сконструированы варианты фермента с измененной специфичностью к PAM [31, 32], а также использованы белки Cas9 из других бактерий [33–40].

Вторая проблема применения Cas9 – разрезание нецелевой частично комплементарной ДНК. Ошибки в распознавании ДНК могут быть следствием неточного спаривания гена и мишени вне района первичного связывания (*seed*) [40, 41]. Существуют два принципиальных подхода к снижению нецелевых эффектов: повышение специфичности Cas9 [42] и ограничение времени ее воздействия на ДНК [40, 43–47].

Практическое применение нашли и другие представители CRISPR-Cas-систем II класса. В 2015 году была описана эффекторная нуклеаза Cas12a (также известная как *Cpf1*) из системы V типа бактерий *Acidaminococcus* и *Lachnospiraceae bacterium* [48]. Cas12a расщепляет обе цепи двунитевой ДНК с помощью одного нуклеазного домена RuvC, что приводит к образованию двунитевого разрыва с 4–5-нуклеотидными 5'-липкими

концами [48, 49]. Как и в случае Cas9, для узнавания мишени необходимо наличие в ней PAM – в данном случае слева от узнаваемой последовательности. После разрезания ДНК-мишени и высвобождения одного из продуктов Cas12a может осуществлять неспецифическое экзонуклеазное расщепление однонитевых ДНК. Это явление было названо “коллатеральной активностью”. В клетке такое расщепление может нарушать различные процессы метаболизма ДНК. На основе коллатеральной активности Cas12a разработаны системы детекции целевых последовательностей ДНК в биологических образцах HOLMES (*an one-Hour Low-cost Multipurpose highly Efficient System*) [50] и DETECTR (*DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter*) [51].

Эффекторная нуклеаза VI типа CRISPR-Cas-систем – Cas13 (также известная как C2c2) – имеет два РНКазных домена HEPN (*higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide binding*). Впервые нуклеаза этого типа была выделена в 2016 году из бактерии *Leptotrichia shahii* [52]. Cas13 с помощью *crRNA* распознает целевую однонитевую РНК и расщепляет ее, при этом также проявляется неспецифическая коллатеральная активность. Cas13 может быть направлена к целевым транскриптам в клетках бактерий, растений и млекопитающих [53]. Эффективность разрушения целевой РНК сравнима с активностью РНК-интерференции с помощью коротких РНК (см. ниже). Однако для Cas13 показано значительно меньше нецелевых эффектов. На основе коллатеральной активности Cas13 создан высокочувствительный метод детекции нуклеиновых кислот SHERLOCK (*Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking*) [54, 55]. В настоящее время технологии детекции с помощью Cas-нуклеаз продолжают разрабатываться и совершенствоваться. Так, в 2020–2021 гг. на этой платформе разработано множество систем для обнаружения коронавируса-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) – возбудителя COVID-19 [56].

В конце 2021 года описаны две группы программируемых нуклеаз транспозонов прокариот. Транспозоны группы IS200/IS605 кодируют белки IcsB – предковые формы Cas9 – и TnpB, от которых произошли нуклеазы Cas12. Они могут направляться к целевой последовательности ДНК с помощью гидовой РНК: ω РНК в случае IcsB и *reRNA* (*right end RNA*) для TnpB. Как и в случае Cas-нуклеаз, для взаимодействия данных нуклеаз транспозонов с целевой ДНК необходимо наличие в ней определенной короткой последовательности TAM (*target-adjacent motif*, или *transposon-associated motif*) справа или слева от узнаваемой последовательности для IcsB и TnpB соответственно. Показана возможность внесения направленных изменений в геном клеток с помощью описанных нуклеаз [57, 58].

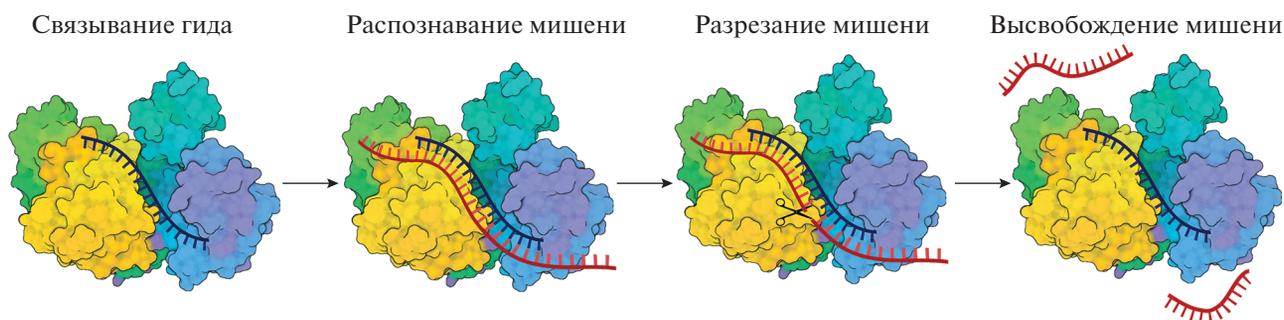


Рис. 2. Расщепление нуклеиновых кислот белками-Аргонавтами. Аргонавт загружается гидовой одноцепочечной молекулой нуклеиновой кислоты (связывание гида), после чего происходит поиск мишени на основании комплементарного соответствия (распознавание мишени). Если мишень комплементарна гиду, конформация фермента меняется, происходит катализ (разрезание мишени) и разрезанная мишень высвобождается (высвобождение мишени).

БЕЛКИ-АРГОНАВТЫ – НОВАЯ ГРУППА ПРОГРАММИРУЕМЫХ НУКЛЕАЗ

Аргонавты эукариот – ключевые белки РНК-интерференции

Белки-Аргонавты (Ago), как и Cas-белки, узнают и разрезают мишень, будучи загруженными комплементарной гидовой нуклеиновой кислотой (рис. 2). В отличие от Cas-нуклеаз, никаких дополнительных последовательностей в мишени (таких как PAM) для этого не требуется. Белки-Аргонавты найдены во всех доменах жизни: у многих бактерий, архей и практически у всех эукариот, из чего следует вывод об их древнем происхождении и функциональной важности [59–61]. У эукариот белки-Аргонавты участвуют в процессе регуляции экспрессии генов малыми РНК, подавлении активности транспозонов и защите клеток от вирусных инфекций [62–68]. Они связывают короткие интерферирующие РНК (siРНК), микроРНК (miРНК) или РНК, ассоциированные с белком PIWI (piРНК), и координируют последующие события сайленсинга генов, взаимодействуя с другими белковыми факторами [68–71]. Образующиеся эффекторные комплексы распознают комплементарные РНК-мишени и могут расщеплять их благодаря эндонуклеазной активности Аргонавтов. Также для них описана не зависящая от расщепления дестабилизация РНК, репрессия транскрипции и трансляции через взаимодействия с другими белками [72, 73].

Среди эукариотических белков-Аргонавтов выделяют три группы [74–76]. Первая включает AGO-подобные белки, которые участвуют в цитоплазматическом посттранскрипционном сайленсинге генов. Вторая группа включает PIWI-подобные белки, которые встречаются преимущественно в герминальных клетках животных; они подавляют экспрессию мобильных генетических элементов и тем самым вносят вклад в поддержание целостности генома [69, 77–79]. Третья группа, WAGO, представлена исключительно белками

червей и исследована на примере *Caenorhabditis elegans*. У разных видов организмов встречается разное число белков-Аргонавтов разных групп. Например, у человека известно четыре белка, относящихся к группе AGO, и четыре – к группе PIWI [68, 80]. Различные пути РНК-интерференции могут работать в одном и том же организме и даже в одной клетке [81].

РНК-интерференция с участием белков группы AGO реализуется по двум альтернативным путям: на уровне РНК или хроматина [80, 82–85]. Собирается комплекс, отвечающий за подавление экспрессии генов с участием РНК (RISC – RNA induced silencing complex). siРНК образуются в цитоплазме в результате процессинга экзогенных и эндогенных двухцепочечных РНК под действием фермента Dicer и представляют собой двухцепочечные РНК длиной 20–30 нуклеотидов. miРНК образуются в ядре из РНК-предшественников, содержащих структуру шпильки, эндонуклеазой Drosha [70, 77, 86–90]. После загрузки короткими двухцепочечными РНК белка-Аргонавта происходит диссоциация одной из цепей дуплекса siРНК, после чего такой комплекс может распознавать полностью или частично комплементарную мРНК-мишень. В результате происходит ингибирование трансляции, эндонуклеазное расщепление мишени Аргонавтом или экзонуклеазная деградация мРНК другими нуклеазами [59, 91–93]. РНК-интерференция может проходить и на уровне хроматина с помощью модификации гистонов или метилирования ДНК, что также позволяет подавить экспрессию генов или в редких случаях приводит к активации транскрипции [80, 94, 95]. Белки группы PIWI также транслоцируются в ядро при загрузке piРНК и подавляют экспрессию транспозонов с помощью транскрипционного сайленсинга генов [69, 84, 96, 97]. В целом, пути РНК-интерференции вовлечены в широкий спектр клеточных функций, включая рост, развитие, апоптоз, а также в патофизиологические процессы, такие как канцерогенез [98].

Все эукариотические Аргонавы имеют в своем составе четыре домена: N-концевой, PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), MID (middle) и PIWI (P-element Induced Wimpy Testis), — они образуют канал, в котором располагаются нуклеиновые кислоты [83, 99–101].

PIWI-домен белков-Аргонавов содержит консервативную тетраду аминокислотных остатков DEDX (где X, как правило, остаток аспарагиновой кислоты, гистидина или лизина), которая координирует два двухвалентных катиона, необходимых для катализа [59]. Многие белки-Аргонавы содержат замены отрицательно заряженных аминокислотных остатков каталитической тетрады и не способны к расщеплению мишени [59–61].

В MID-домene находится карман для связывания 5'-конца молекулы-гида. В ряде случаев 5'-концевой нуклеотид гидовой цепи связывается специфично. Так, hAgo2 человека, KrAgo из дрожжей *Kluyveromyces polysporus* и SIWI из шелкопряда *Bombyx mori* связывают гиды, содержащие остаток уридина на 5'-конце [99, 102, 103]. Соответствующий неспаренный нуклеотид цепи-мишени может специфически распознаваться в отдельном кармане домена PIWI [104].

PAZ — небольшой домен (~140 а.о.), который участвует в связывании 3'-конца гидовой цепи, однако не является для этого абсолютно необходимым. Интересно, что PAZ присутствует не только в Аргонавах, но и в белке Dicer. Вероятно, PAZ-домен предка современных эукариотических Аргонавов претерпел дубликацию и попал в Dicer [105].

N-концевой домен наименее консервативен и, по-видимому, способствует разделению РНК-дуплекса [99, 106–108].

Аргонавы прокариот: разнообразие структур

О существовании генов Аргонавов у бактерий и архей было известно достаточно давно, и белки AfAgo из археи *Archaeoglobus fulgidus* [109–112] и AaAgo из бактерии *Aquifex aeolicus* [113–115] даже использовали в качестве модели для структурных исследований РНК-интерференции. Первое описание разнообразия прокариотических Аргонавов выполнено в 2009 году [59]. К. Макарова и соавт. обнаружили в невырожденной белковой базе данных RefSeq 85 гомологов эукариотических Аргонавов, закодированных в 80 прокариотических геномах. Быстрый рост числа секвенированных геномов бактерий и архей в последние годы позволил найти намного больше Аргонавов: 487 в 2014 году [61], 1010 в 2018 [60] и 1711 в 2020 [116]. В целом, около 10–20% геномов бактерий и около четверти архейных геномов кодируют хотя бы один Аргонавт, а в редких случаях прокариотиче-

ский геном содержит сразу несколько генов Аргонавов.

На филогенетическом дереве белков-Аргонавов (рис. 3) выделяют две большие группы: длинные Аргонавы, содержащие те же 4 домена, что и эукариотические белки, и короткие (“short”), в которых отсутствуют домены N-концевой и PAZ [59–61]. Все короткие Аргонавы имеют замены в активном центре в домене PIWI, что свидетельствует об отсутствии у них каталитической активности. Длинные Аргонавы подразделяются на две группы, названные “longA” и “longB” [60]. Все представители группы B относятся к неактивным Аргонавам и зачастую имеют укороченный домен PAZ, в то время как большинство длинных Аргонавов группы A обладает каталитической тетрадой и полноразмерным PAZ. Тем не менее некоторые представители различных ветвей группы A также содержат замены в каталитической тетраде, что указывает на многократное появление неактивных форм в ходе эволюции [59–61]. Филогенетический анализ показал, что эукариотические Аргонавы являются монофилетической группой и происходят из длинных прокариотических Аргонавов группы A [59–61]. Интересно, что филогенетическое дерево прокариотических Аргонавов не соответствует таксономическому дереву живых организмов. Из этого можно сделать вывод о существенном вкладе горизонтального переноса в распространении генов Аргонавов среди бактерий и архей [59–61].

К настоящему моменту охарактеризовано несколько десятков Аргонавов прокариот из разных ветвей филогенетического дерева. В таблице 1 приведено описание свойств большинства исследованных к настоящему времени прокариотических белков-Аргонавов. Внимание большей частью сфокусировано на изучении в системе *in vitro* Аргонавов бактерий и архей, обладающих нуклеазной активностью. В отличие от Аргонавов эукариот, работающих в клетке с РНК-гидами и РНК-мишенями, прокариотические Аргонавы преимущественно распознают ДНК-мишени. Некоторые из них расщепляют и РНК-мишени, хотя и менее эффективно; функциональная значимость этого феномена до сих пор не выяснена [100, 126, 148]. Большинство прокариотических Аргонавов связывают ДНК-гида, но некоторые (MrAgo из бактерии *Marinitoga piezophila* и его ближайшие гомологи) предпочитают РНК-гида [130]. Стоит сказать, что некоторые Аргонавы эукариот тоже могут использовать ДНК-гида для распознавания мишеней *in vitro* (например, hAgo2) [107, 156] и даже участвовать в репарации ДНК (AGO1 из *Arabidopsis thaliana*) [157], но, способны ли они при этом взаимодействовать с ДНК *in vivo*, пока неизвестно.

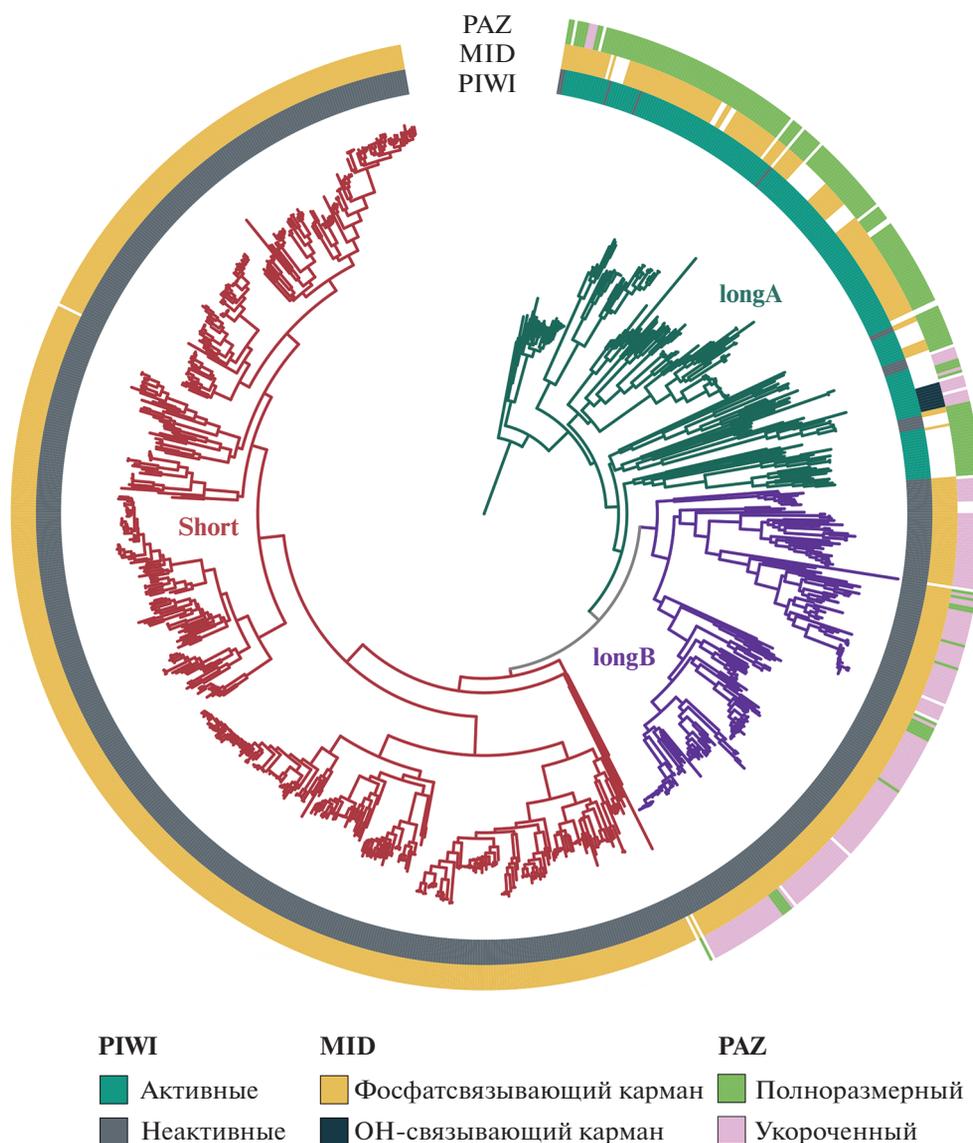


Рис. 3. Филогенетическое дерево прокариотических белков-Аргонавтов. Дерево построено по данным, опубликованным в статье [59]. Множественное выравнивание доменов MID и PIWI выполнено в программе MAFFT (v7.487) [117]. Для построения дерева использовали программу IQ-TREE (v2.1.4-beta) [118–120]. Цвета ветвей соответствуют группам Аргонавтов: longA (темно-зеленый), longB (фиолетовый), short (бордовый). В кругах цветом отмечены особенности устройства доменов PIWI (внутренний круг; активные белки – зеленый, неактивные – серый), MID (второй круг; фосфатсвязывающий домен – желтый, ОН-связывающий домен – черный) и PAZ (внешний круг; полноразмерный PAZ – светло-зеленый, укороченный – розовый); в коротких Аргонавтах домен PAZ отсутствует.

В отличие от Аргонавтов эукариот, прокариотические Аргонавты не нуждаются во вспомогательных белках для загрузки гидовыми нуклеиновыми кислотами. Для TtAgo из бактерии *Thermus thermophilus*, MjAgo из археи *Methanocaldococcus jannaschii*, SeAgo из бактерии *Synechococcus elongatus*, CbAgo из бактерии *Clostridium butyricum* и LrAgo из бактерии *Limnithrix rosea* показан независимый от гида процессинг плазмидной ДНК *in vitro* и загрузка фрагментами плазмиды в качестве гидов без дополнительных белковых факторов [122, 132, 142, 145].

Домены MID и PIWI наиболее консервативны и присущи всем белкам-Аргонавтам. MID-домен играет ключевую роль в связывании 5'-конца гидовой нуклеиновой кислоты. У прокариот и PIWI-белков эукариот аминокислотные остатки MID-кармана координируют двухвалентный катион (Mg^{2+} или Mn^{2+}), участвующий в связывании 5'-концевого фосфата гида [100, 103, 110, 111, 148, 158]. Однако среди активных Аргонавтов прокариот есть небольшая группа белков с гидрофобным карманом в MID-домене. Структурный анализ одного из представителей этой группы,

Таблица 1. Характеристика активных белков-Аргонавтов прокариот и эукариот

| Организм | Аргонавт, protein ID | Гид, длина ^a | 5'-конец гида ^b | Мишень | Температура реакции ^c | Ион | Мисматчи в дуплексе ^d | Каталитическая активность | Источник |
|--|--|--|---------------------------------|---------------------|---|---|--|---|--------------------|
| Аргонавты прокариот | | | | | | | | | |
| <i>Aquifex aeolicus</i> | AaAgo, WP_010880937.1 | ДНК 18–24 | 5'-P; ? | РНК, (ДНК ?) | опт. 55°C; до 75°C | Mg ²⁺ , Mn ²⁺ | ? | При загрузке гидом | [113–115] |
| <i>Clostridium butyricum</i> (штаммы ТК520, CWBI 1009) | CbAgo, WP_058142162.1; CbсAgo, WP_045143632.1 | ДНК ^e (РНК слабо) 16–18 | 5'-P; нет | ДНК* (РНК слабо) | опт. 37°C; 30–60°C (CbсAgo опт. 37–42°C; 25–55°C) | Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ | ↓5, 6, 12–15 н | При загрузке гидом; без гида | [116, 121– 123] |
| <i>Clostridium perfringens</i> | CrAgo, WP_003477422.1 | ДНК 15–30 (≥12) | 5'-P; нет | ДНК (РНК) | опт. 37°C; 4–70°C | Mg ²⁺ , Mn ²⁺ | ↓12–15 н | При загрузке гидом | [124] |
| <i>Ferroplasma placioides</i> | FpAgo, WP_012966655.1 | ДНК 15–16 | 5'-P; G1 | ДНК | 75–99°C | Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ | ↑7 н; ↓3,8,11–15 н | При загрузке гидом | [125] |
| <i>Intestinibacter bartlettii</i> | IbAgo, WP_007287731.1 | ДНК 15–30 (≥14) | 5'-P; нет | ДНК | опт. 37°C; 4–60°C | Mg ²⁺ , Mn ²⁺ | ↓14–16 н | При загрузке гидом | [124] |
| <i>Kurtzia massiliensis</i> | KmAgo, WP_010289662.1 | ДНК (РНК) 16–20 (≥12) | 5'-P; нет | ДНК (РНК) | опт. 37–60°C; от 25°C | Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , слабо Co ²⁺ | ↓4, 5, 10–15 н (ДНК–ДНК); ↓4, 8–11 н (ДНК–РНК); ↓3–11 н (РНК–ДНК) | При загрузке гидом; без гида (37°C) | [126, 127] |
| <i>Limothrix rosea</i> | LrAgo, WP_075892274.1 | ДНК ^e 16–18 (≥10) | 5'-P; нет | ДНК | опт. 37°C; 30–54°C | Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , очень слабо Co ²⁺ | ↑4–8; ↓10–15 н | При загрузке гидом; без гида | [122] |
| <i>Methanocaldococcus fervens</i> | MfAgo, WP_015791216.1 | ДНК, РНК 16 | 5'-P-ДНК и РНК; 5'-ОН-ДНК | ДНК | опт. 80–90°C; от 54°C | Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Co ²⁺ | ? | При загрузке гидом | [128] |
| <i>Marinotoga piezophila</i> | MpAgo, WP_014295921.1 | РНК 16–40 | 5'-ОН; нет | ДНК (РНК) | 37, 55, 60°C | Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , слабо Ni ²⁺ | ↓5, 7, 8 н; ↓5–15 н динук- леотидные замены | При загрузке гидом | [129–131] |
| <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> | MjAgo, WP_010870838.1 | ДНК 15–41 | 5'-P; пуринны | ДНК | опт. 75–95°C; от 37°C | Mg ²⁺ | ? ↓10–11 динуклеотид | При загрузке гидом; без гида | [101, 132, 133] |

Таблица 1. Окончание

| Организм | Аргонавт, protein ID | Гид, длина ^a | 5'-конец гида ^b | Мишень | Температура реакции ^c | Ион | Мисматчи в дуплексе ^d | Каталитическая активность | Источник |
|--|-----------------------|--------------------------------------|----------------------------|------------------------|--|---|---|------------------------------|---------------------|
| <i>Naerobacterium gregoryi</i> | NgAgo, WP_005580376.1 | ДНК 22–24 | 5'-P; ? | ДНК? (РНК?) | 37°C | Mg ²⁺ | ? | При загрузке гидом | [134–138] |
| <i>Ryrococcus furiosus</i> | RfAgo, WP_011011654.1 | ДНК 15–31 | 5'-P; нет | ДНК | опт. 87–99.9°C; от 37°C | Mn ²⁺ , Co ²⁺ | ? | При загрузке гидом; без гида | [139–141] |
| <i>Syrtetococcus elongatus</i> | SeAgo, WP_011244830.1 | ДНК ^e 14–24 | 5'-P; нет | ДНК ^e | опт. 37°C | Mn ²⁺ , слабо Mg ²⁺ | ↑5, 6, 10; ↓7, 12–15, 18 н | При загрузке гидом; без гида | [142] |
| <i>Thermotoga profunda</i> | TrAgo, WP_041081268.1 | РНК 21 | 5'-ОН; ? | ДНК | 60°C | Mg ²⁺ , Mn ²⁺ | ? | При загрузке гидом | [130] |
| <i>Thermus thermophilus</i> | TtAgo, WP_011174533.1 | ДНК ^e 13–25 | 5'-P; C1 G1' | ДНК ^e (РНК) | опт. 73–75°C; ≥20°C; оцДНК; ≥65°C плазмиды | Mn ²⁺ , Mg ²⁺ | ↓12–15 н | При загрузке гидом; без гида | [100, 106, 143–149] |
| Аргонавты эукариот | | | | | | | | | |
| <i>Homo sapiens</i> | hAgo2, NP_036286.2 | РНК ^e (ДНК) 20–21 | 5'-P; U1 A1' | РНК ^e | 37°C | Mg ²⁺ | ↓2–8 н (связывание мишени); ↓8–11 н тройной мисматч | При загрузке гидом | [99, 139, 150–152] |
| <i>Kluyveromyces fragilis</i> (<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>) | KrAgo, XP_001644461.1 | РНК ^e (ДНК) 12–17 (11–25) | 5'-P; U1 | РНК ^e | 25–30°C | Mg ²⁺ | ↓7–14 н (↓↓9–13) | При загрузке гидом | [102, 153] |
| <i>Volvox mori</i> | SIWI, NP_001098066.2 | РНК ^e 28–30 | 5'-P; U1 | РНК ^e | 26, 37°C | Mg ²⁺ , Mn ²⁺ | ↓2–7 н (связывание мишени) | При загрузке гидом | [103, 154, 155] |

^a Тип гидовой нуклеиновой кислоты и ее длина (число нуклеотидов).

^b Характеристика 5'-конца гида: P – фосфатная группа, OH – гидроксильная группа; наличие специфичности к азотистому основанию: нет – нет специфичности, A/U/G/C – типы азотистых оснований, 1 – первый нуклеотид гидовой цепи; 1' – первый нуклеотид цепи-мишени. Здесь и далее: ? – неизвестно.

^c Температура, при которой Аргонавт способен к разрезанию мишени; опт. – температурный оптимум, также приведен диапазон температур, при которых Аргонавт разрезает мишень. Дискретные значения температуры приведены для публикаций, где измерения проводились только в данных условиях.

^d Влияние мисматчей (несопаренных нуклеотидов дуплекса гид–мишень) на эффективность разрезания мишени; позиции нуклеотидов (н) пронумерованы относительно 5'-конца гида. ↑ – увеличение эффективности расщепления, ↓ – снижение эффективности расщепления.

^e Как *in vitro*, так и *in vivo*.

MrAgo из *Marinitoga piezophila*, показал, что такие Аргонавты не связывают двухвалентный катион в MID-кармане и “предпочитают” нефосфорилированные по 5'-концу гиды [60, 130].

Некоторые Аргонавты бактерий и архей дискриминируют гиды по азотистому основанию 5'-концевого нуклеотида: RsAgo из бактерии *Rhodobacter sphaeroides* связывает гиды, содержащие урацил на 5'-конце, TtAgo из бактерии *Thermus thermophilus* – цитозин, FpAgo из археи *Ferroplasma acidophilum* – гуанин, MjAgo из археи *Methanocaldococcus jannaschii* – пурины. В то же время другие исследованные Аргонавты прокариот не проявляют специфичности в связывании 5'-концевого нуклеотида (табл. 1) [101–103, 122, 124, 125, 130, 141, 142, 146, 159]. Соответствующий неспаренный нуклеотид цепи-мишени может специфически распознаваться в отдельном кармане домена PIWI (G – для TtAgo, A – для RsAgo) [145, 158].

Будучи связанным в MID-кармане, 5'-концевой нуклеотид молекулы-гида не участвует в образовании водородных связей с мишенью и называется якорным (“anchor”). Также в гиде выделяют район первичного связывания (“seed”) – 2–8 нуклеотидов, сайт расщепления – 10–11 нуклеотидов, 3'-дополнительный (“supplementary”) сайт – 12–16 нуклеотидов и 3'-концевой участок, последний нуклеотид которого обычно связывается в кармане PAZ-домена [151, 160–164]. Большинство активных Аргонавтов расщепляет мишень между позициями, комплементарными 10 и 11 нуклеотидам гидовой цепи [100, 101, 132, 133, 148]. Некоторые прокариотические Аргонавты, в норме связывающие 5'-фосфорилированные гиды, также могут использовать и 5'-ОН гиды, например CbAgo, LrAgo, KmAgo, SeAgo, однако в этом случае сайт расщепления сдвигается на один нуклеотид [122, 123, 126, 142].

Связывание комплементарной мишени Аргонавтом, загруженным гидом, сопровождается структурными перестройками, которые включают вращение домена PAZ и изменение взаиморасположения нескольких петель в домене PIWI [100, 129, 144, 148]. 3'-Конец гидовой цепи высвобождается из PAZ и образуется каталитически активный тройной комплекс Аргонавта с гидом и мишенью [165, 166].

Для эукариотических Аргонавтов показана важность комплементарности гида и мишени в позициях 2–8 дуплекса, считая от 5'-конца гида в районе первичного связывания (“seed”). Некомплементарные нуклеотиды и инсерции в гиде напротив места разрезания мишени также значительно уменьшают эффективность расщепления мишеней, а мисматчи в 3'-концевом участке не оказывают значительного влияния [151, 163, 167]. Такую общую закономерность нельзя выявить для Аргонавтов прокариот, вероятно, в связи с их

большим разнообразием. Взаимодействия гидов с не полностью комплементарными мишенями могут по-разному влиять на активность прокариотических Аргонавтов. Показано, что TtAgo и RsAgo могут связывать дуплекс гида с мишенью с инсерциями в seed-районе без существенных изменений структуры [158, 168, 169]. У LrAgo и SeAgo некомплементарные взаимодействия в районе первичного связывания даже стимулируют расщепление ДНК [122, 142]. Интересно отметить, что наличие дополнительных или некомплементарных нуклеотидов в seed-районе стимулирует высвобождение гибрида “гид–мишень” из hAgo2 и прокариотического RsAgo, что может быть механизмом замены молекул гида, связанных с Аргонавтом [150, 158]. В отличие от Аргонавтов эукариот, CbAgo, LrAgo, SeAgo и TtAgo чувствительны к наличию неспаренного участка в 3'-дополнительной области ДНК-гида [122, 142, 143]. В целом, подобные эксперименты необходимы для понимания специфичности выбора и разрезания мишени при изучении новых прокариотических Аргонавтов разных групп.

Остается открытым вопрос о том, какие именно особенности строения прокариотических Аргонавтов отвечают за дискриминацию РНК/ДНК-гидов и мишеней, а также за чувствительность к нарушениям комплементарности в дуплексе гид–мишень. Вероятно, эти особенности, в первую очередь, определяются различиями в строении доменов MID и PIWI. Для ответа на поставленный вопрос необходимы дальнейшие исследования активности и структур прокариотических белков-Аргонавтов.

Белки-Аргонавты защищают клетки прокариот от чужеродных нуклеиновых кислот

Еще в 2009 году было высказано предположение о возможной роли прокариотических Аргонавтов в защите клеток от вирусов [59]. В то же время экспериментальные данные, подтверждающие эту гипотезу, появились совсем недавно.

Во-первых, показано, что гены Аргонавтов часто находятся в так называемых “защитных островах” (defence islands) – участках генома с повышенной мобильностью, в которых кодируются различные системы, защищающие бактерии и археи от чужеродных нуклеиновых кислот. Наиболее известные защитные механизмы прокариот – это системы рестрикции-модификации и CRISPR-Cas. На сегодняшний день известно более сотни таких систем, и это число продолжает расти [170–173]. Гены с неизвестной функцией, часто закодированные в защитных островах, с высокой вероятностью также вовлечены в работу защитных систем [59, 174–176]. Интересно, что некоторые группы прокариотических Аргонавтов ассоциированы с определенными защитными системами.

Так, использующий РНК-гиды MrAgo и его ближайшие гомологи кодируются вблизи систем CRISPR-Cas [130]. Более обширный анализ показал, что активные Аргонавты бактерий и архей в большинстве случаев кодируются в геномах, содержащих также CRISPR-Cas-системы, в то время как геномы без Аргонавтов или с неактивными Аргонавтами содержат CRISPR-Cas-системы намного реже [116]. Более подробный анализ ассоциации различных групп Аргонавтов с другими защитными системами прокариот — предмет дальнейших исследований.

Во-вторых, некоторые прокариотические Аргонавты ассоциированы с дополнительными доменами, выполняющими защитные функции. Так, многие короткие Аргонавты имеют в своем составе домены SIR2 (silent information regulator 2) или TIR (Toll/interleukin-1 receptor) или кодирующие их последовательности находятся в соседнем гене [59, 60]. Эти домены также входят в защитную систему Thoeris, найденную у бактерий: в ответ на заражение клетки вирусом они расщепляют NAD^+ , что приводит к смерти клетки и остановке распространения вируса в популяции [175, 177, 178]. Недавно показано, что системы SIR2/Ago и TIR/Ago защищают клетки бактерий от фагов и плазмид: MID-PIWI домены Аргонавтов узнают чужеродную ДНК, а SIR2 или TIR расщепляет NAD^+ [178, 179]. Система TIR/Ago также участвует в защите от плазмид. Некоторые Аргонавты ассоциированы в оперонах с нуклеазами из разных семейств, которые, предположительно, участвуют в продукции гидов или выполняют роль белков-эффекторов защитных систем [59, 60].

Наконец, в последние годы получены прямые экспериментальные подтверждения защитной роли длинных Аргонавтов в бактериях. Так, белок CbAgo защищает клетки от фагов [116], белки CbAgo [116], PfAgo (из археи *Pyrococcus furiosus*) [141] и RsAgo [159] снижают эффективность трансформации и способствуют деградации плазмид в бактериальных клетках.

Помимо защиты клеток от чужеродной ДНК Аргонавты могут выполнять и другие функции. К настоящему моменту известен один такой пример: показано, что в отсутствие гиразы TtAgo участвует в клеточном делении, разрешая катенаны хромосом после репликации в клетках *Thermus thermophilus* [149]. Разнообразие строения и особенностей активности прокариотических Аргонавтов может свидетельствовать о том, что их функциональная роль в клетках бактерий и архей не ограничивается известными на сегодняшний день примерами.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ-АРГОНАВТОВ

Белки-Аргонавты считаются перспективными кандидатами для направленных манипуляций с нуклеиновыми кислотами и редактирования геномов. Способность белков-Аргонавтов работать в качестве сайт-специфических программируемых нуклеаз открывает широкие возможности для их применения *in vitro*. Известные к настоящему моменту области применения белков-Аргонавтов бактерий суммированы на рис. 4.

В отличие от часто используемых в лабораторной практике эндонуклеаз рестрикции, с помощью белка-Аргонавта можно внести разрез потенциально в любую последовательность ДНК и получать фрагменты с “липкими” концами необходимой длины и нуклеотидного состава. В связи с тем, что Аргонавты имеют единственный активный центр и могут расщепить только одну цепь ДНК, для расщепления двунитевой ДНК необходимо загружать Аргонавты гидами, комплементарными противоположным цепям в районе сайта разрезания. Так, Аргонавт PfAgo термофильной бактерии успешно использован для сборки генетических конструкций, а также для их анализа [185]. В масштабном исследовании с использованием панели гидов для Аргонавта TtAgo определены закономерности предпочтения к последовательностям гидов. На основании результатов, полученных в ходе этой работы, можно существенно оптимизировать “работу” TtAgo в качестве программируемой эндонуклеазы [143, 186].

Важное направление применения белков-Аргонавтов — детекция целевых последовательностей и модификаций нуклеотидов в биологических образцах. Система обнаружения искомой последовательности в образце, разработанная на основе PfAgo, получила название PAND (PfAgo-mediated Nucleic acid Detection). В методике используют репортерную ДНК, при расщеплении которой Аргонавтом происходит разобщение флуоресцентной метки и гасителя и появляется флуоресцентный сигнал (рис. 4). Гидом для разрезания репортера служит фрагмент искомой последовательности ДНК, который вырезается из ДНК образца с помощью PfAgo и комбинации трех синтетических гидов. При использовании репортеров с различными флуоресцентными маячками возможна детекция нескольких последовательностей в одной пробирке [180]. Этот метод успешно адаптировали для идентификации РНК SARS-CoV-2 и его мутантного варианта (D614G в белке шипа) в образцах, полученных от пациентов [187]. Объединение двух методов: PAND и лигазной цепной реакции, позволило упростить процедуру детекции нуклеиновых кислот. Комбинированный протокол получил название

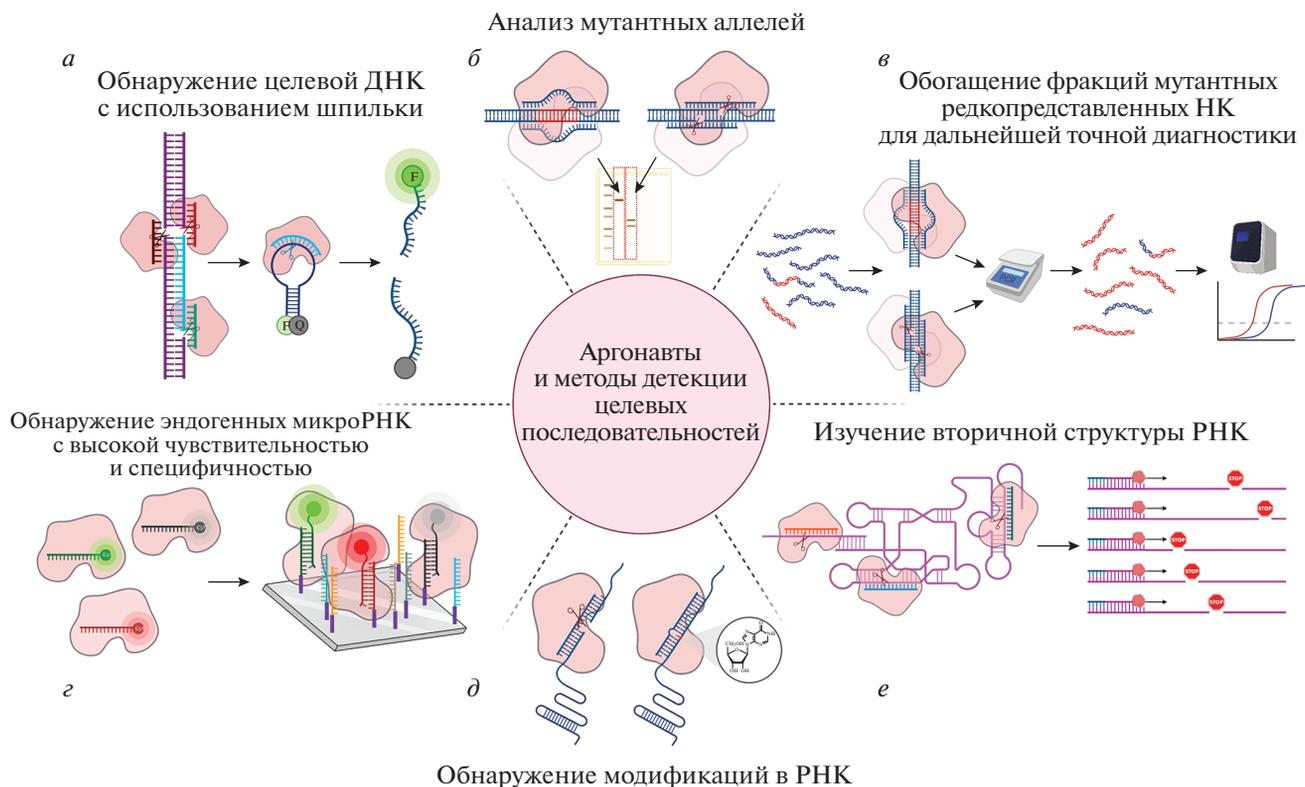


Рис. 4. Детекция целевых последовательностей в биологических образцах с использованием белков-Аргонавтов. *а* – Детекция нуклеиновых кислот с помощью Аргонавтов. Аргонавт программируют так, чтобы вырезать из ДНК целевую последовательность; кроме того, в образец добавляют комплементарный этой последовательности олигонуклеотидный зонд, имеющий структуру шпильки, к концам которой присоединены флуоресцентная метка (F) и гаситель (Q). При первом раунде катализа Аргонавт вырезает целевую последовательность в образце, после чего связывают ее в качестве гида и осуществляют второй раунд катализа, в результате чего происходит расщепление флуоресцентного зонда. По увеличению интенсивности свечения судят о наличии целевой последовательности [180, 181]. *б* – Анализ мутантных аллелей в биологических образцах. Для обнаружения мутантного аллеля ДНК сначала амплифицируют, а затем ПЦР-продукты инкубируют при 98°C с Аргонавтом с парными ДНК-гидами, соответствующими одному из вариантов целевой последовательности; продукты разделяют в агарозном геле [182]. *в* – Детекция редких вариантов ДНК. Образец с мутантной ДНК инкубируют с Аргонавтом, загруженным гидами к последовательности дикого типа; после катализа целыми остаются только мутантные ДНК; их количество можно оценить с помощью ПЦР в реальном времени или другими методами [183]. НК – нуклеиновая кислота. *г* – Для детекции микроРНК каталитически неактивный Аргонавт загружают гидом, соответствующим целевой последовательности и содержащим флуоресцентную метку; после инкубации с иммобилизованными на чипе miРНК детектируют сигнал флуоресценции гидов, иммобилизованных в комплексе с Аргонавтами и miРНК-мишенью [184]. *д* – Выявление модификаций в РНК (например, присутствие инозина в интересующей последовательности предотвращает разрезание мишени) [131]. *е* – Анализ вторичной структуры РНК. Структурированные РНК инкубируют с Аргонавтами, загруженными гидами к различным участкам последовательности; сайты разрезания можно детектировать напрямую или с помощью обратной транскрипции [126, 127, 153].

PLCR (PfAgo coupled with modified Ligase Chain Reaction for nucleic acid detection). Термостабильная лигаза соединяет две половины гида, используя целевую ДНК как матрицу. Далее в ходе нескольких циклов происходит амплификация гидов. Гид загружается в Аргонавт, происходит разрезание репортерной ДНК, в результате чего появляется флуоресцентный сигнал [181].

Другие предложенные методы основаны на принципе снижения активности Аргонавта при наличии в мишени замены или модификации – по сравнению с ситуацией, когда гид и мишень полностью комплементарны (рис. 4). Быстрый анализ наличия инсерций или делеций в одной

или двух аллелях целевого гена, возникающих при редактировании генома, возможен, если подобрать гида к месту расщепления ДНК редактирующей нуклеазой. В случае аллеля дикого типа произойдет разрезание ДНК Аргонавтом. Продукты реакции можно детектировать в геле [182]. Для обнаружения редких однонуклеотидных замен, возникающих, например, в раковых клетках, разработан метод NAVIGATER (Nucleic Acids of clinical interest Via DNA-Guided Argonaute from *Thermus thermophilus*). Для обнаружения ДНК или РНК с однонуклеотидной заменой нужно подобрать гид так, чтобы он был комплементарен преобладающим в образце последовательностям ди-

кого типа, а редкий вариант имел замену в 10 или 11 положении мишени, считая от 5'-конца гида. Наличие замены резко снижает нуклеазную активность TtAgo. В этом случае ДНК дикого типа будет расщеплена Аргонавтом и относительное содержание редкого варианта повысится. Такое обогащение дает возможность детектировать редкий вариант стандартными методами: различными вариантами ПЦР или секвенированием [183].

Для обнаружения замен и модификаций в РНК необходимо использовать Аргонавт с соответствующей специфичностью. MrAgo использует в качестве гидов РНК и может связывать комплементарную РНК-мишень. Для распознавания мишени наиболее важны 6 и 7 нуклеотид. С помощью определения прочности ассоциации гидовой РНК с мишенью возможно идентифицировать мисматчи, а также модифицированные нуклеотиды, такие как инозин (рис. 4) [131]. Разность в эффективности расщепления одно- и двунитевой РНК может быть использована для изучения строения высокоструктурированных РНК. Возможность направлять Аргонавт к определенным последовательностям РНК позволяет изучать структуру конкретных участков РНК в различных условиях [126, 127, 153].

Аргонавты также нашли применение в микроскопии супер разрешения для визуализации структур, находящихся за дифракционным пределом микроскопии. Метод DNA-PAINT (DNA Point Accumulation In Nanoscale Topology) основан на детекции ассоциации и диссоциации флуоресцентного ДНК-зонда с закрепленной ДНК-мишенью. В случае, если меченый ДНК-гид загружен в Аргонавт CbAgo, скорость процесса повышается за счет того, что Аргонавт организует гидовую ДНК для оптимального связывания мишени [188]. Способность Аргонавта ускорять связывание флуоресцентно меченного ДНК-гида с РНК-мишенью также была использована для специфической визуализации miРНК. Авторы, S. Shin и др. [184], назвали эту технологию Ago-FISH (Argonaute-based Fluorescence In Situ Hybridization) (рис. 4).

Способность Аргонавтов вносить сайт-специфические разрезы в нуклеиновые кислоты позволяет рассматривать их как потенциальные инструменты для редактирования генома и транскриптома. В этом качестве Аргонавты могут иметь некоторые преимущества перед наиболее широко используемыми сейчас Cas-нуклеазами. Во-первых, Аргонавты не требуют наличия РАМ-последовательности в целевой ДНК. Во-вторых, гиды большого размера Аргонавтов прокариот представляют собой короткие ДНК, в то время как для Cas необходимы длинные РНК-гиды. Синтез ДНК гораздо дешевле, это открывает возможности для широкого применения системы

редактирования генома, основанного на использовании Аргонавтов. В-третьих, размер молекулы Аргонавта меньше, чем Cas9, поэтому их легче доставлять внутрь клеток [189, 190].

В 2016 году опубликована работа по редактированию генома клеток человека с помощью Аргонавта из галофильной археи *Natronobacterium gregoryi* (NgAgo) [189]. Однако вскоре авторы отозвали статью, так как другие группы исследователей не подтвердили достоверность изложенных в ней результатов при попытках внести с помощью NgAgo изменения в геном клеток человека, эмбрионов мыши и эмбрионов *Danio rerio*, а также вируса гепатита В [135, 137, 138, 191–194]. Также не удалась попытка редактирования генома клеток человека с использованием Аргонавта TtAgo [135]. Таким образом, вопрос о возможности применения Аргонавтов в качестве инструмента редактирования генома остается открытым. Следует сказать, что выбор белка-Аргонавта может значительно повлиять на результаты таких экспериментов. В опубликованных работах использовали Аргонавты из термофильных микроорганизмов – с оптимумом работы при высоких температурах. Кроме того, NgAgo – белок из галофильной археи, а известно, что экспрессия и сворачивание таких белков происходит неэффективно в нормальных солевых условиях [195]. В некоторых исследованиях, не давших положительного результата, на С-конец Аргонавта был добавлен сигнал ядерной локализации (nuclear localization signal, NLS) [135, 137, 193]. Это могло повлиять на активность белка, так как С-конец Аргонавта важен для катализа [144]. Также использовали гиды к последовательностям, находящимся на противоположных цепях ДНК на большом расстоянии друг от друга [194]. В нескольких исследованиях с использованием NgAgo заметили снижение уровня мРНК целевого гена без внесения изменений в соответствующий участок генома, возможно, из-за взаимодействий Аргонавта с РНК-мишенями [137, 138]. Таким образом, для проведения дальнейших экспериментов по редактированию генома стоит выбирать высокоспецифичные к ДНК-мишеням Аргонавты, активность которых оптимальна при физиологических условиях.

Аргонавты с нефункциональным каталитическим центром – неактивные Аргонавты или мутантные формы активных Аргонавтов – также имеют большой потенциал практического применения. Такие Аргонавты распознают целевые последовательности ДНК или РНК с помощью гидов и потенциально могут быть использованы в качестве ДНК-распознающего домена при конструировании химерных белков с различными функциями. Ранее подобные подходы с успехом использовали в случае Cas-нуклеаз. Возможные области применения каталитически неактивных

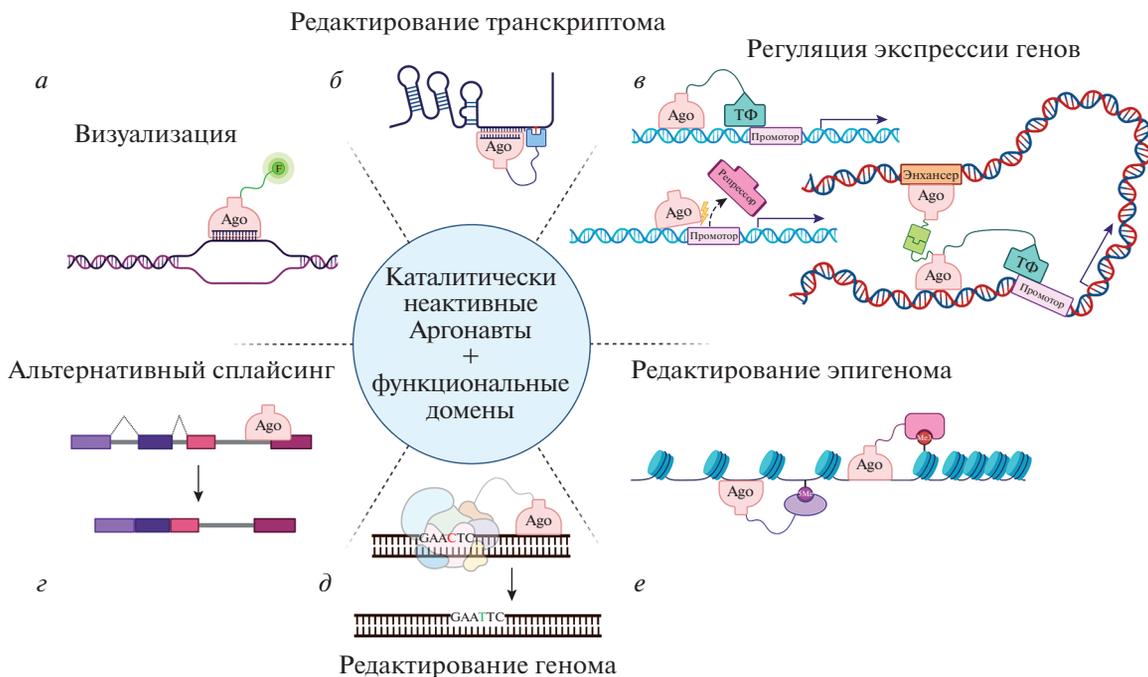


Рис. 5. Перспективные направления применения каталитически неактивных Аргонавтов в биотехнологии. *a* – Аргонавт (Ago) может быть шит с флуоресцентной меткой (F) и загружен гидом, комплементарным интересующей последовательности. *б* – Аргонавт может быть объединен с ферментами, заменяющими или модифицирующими нуклеотиды в составе РНК. *в* – Объединение Аргонавта с транскрипционным фактором (ТФ) может усилить транскрипцию конкретного гена; сходный эффект достигается при конкуренции Аргонавта с белком-репрессором транскрипции; Аргонавт с дополнительными доменами может усилить связь энхансера с промотором интересующего гена и тем самым активировать транскрипцию. *г* – При нацеливании Аргонавта на конкретный участок пре-мРНК можно регулировать ее сплайсинг. *д* – Для программируемого изменения конкретных участков генома Аргонавт может быть шит с различными ферментами системы редактирования ДНК. *е* – Для редактирования эпигенома Аргонавт может быть соединен с ферментами, модифицирующими гистоны и ДНК (маленьким красным кругом обозначена модификация гистона, сиреневым – метилирование цитозина в ДНК).

белков-Аргонавтов бактерий суммированы на рис. 5. Например, соединение Аргонавтов с ферментами, модифицирующими азотистые основания, может быть использовано для внесения изменений в последовательность ДНК или РНК без образования двухцепочечного разрыва. Цитидиндезаминаза конвертирует цитидин в уридин, что приводит к замене пары С:G на Т:А при репликации ДНК [196]. Провести обратную замену – пары Т:А на С:G – может химерный белок, содержащий в качестве функционального домена аденозиндезаминазу, которая превращает аденин в инозин, распознаваемый полимеразой как гуанин [197].

Аргонавты могут использоваться как ДНК-распознающий домен для привлечения к нужным местам ДНК факторов, изменяющих эпигенетические метки и тем самым активирующих или инактивирующих экспрессию генов (рис. 5). Для этого могут быть использованы подходы, ранее предложенные для каталитически неактивных вариантов Cas-нуклеаз. Активации или подавления экспрессии генов можно добиться, соединив Аргонавт соответственно с транскрипционными акти-

ваторами или репрессорами. Например, направление цитозин-ДНК-метилтрансферазы DNMT3A к промотору целевого гена позволяет снизить его экспрессию. Использование домена KRAB (Krüppel-associated box), образующего комплекс с двумя ДНК-метилтрансферазами гистонов, приводит к репрессии целевых генов. Соединение с ацетилтрансферазой р300 приводит к ацетилрованию лизина в позиции 27 гистона H3 и, как следствие, к транскрипционной активации целевых генов [40, 198]. Изменение взаиморасположения участков ДНК в ядре может приводить к изменению экспрессии генов, например при сближении промоторов и энхансеров [199]. Для этого могут быть использованы неактивные Аргонавты, соединенные с гетеродимеризующимися белковыми доменами. Также Аргонавты могут быть использованы в качестве ДНК-распознающего домена для визуализации различных структур и процессов, происходящих в ядре в случае сшивков с флуоресцентными белками, как это было показано для нуклеаз TALEN [200], или в качестве РНК-распознающего домена для визуализации местонахождения целевых РНК в клетке (рис. 5).

Неактивные Аргонавты, взаимодействующие с РНК-мишенями, могут быть использованы для привлечения к РНК дополнительных функциональных доменов для регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Например, эффекторные домены белков YTHDF1 и YTHDF2 (YTHDF1-В Homology Domain Family) в эукариотических клетках распознают N6-метиладенозин в РНК. YTHDF1 активирует трансляцию целевой РНК, а YTHDF2, наоборот, приводит к ее деградации. Замена домена, распознающего N6-метиладенозин, на РНК-распознающий домен позволяет направить эти функции к произвольно выбранной РНК [201]. Также возможно точечное редактирование РНК с помощью дезаминазного домена белка ADAR1 (Adenosine Deaminase Acting on RNA) или ADAR2 человека. Этот белок превращает аденозин в инозин, преимущественно в тех случаях, когда аденозин стоит напротив цитидина в РНК-дуплексе [202]. Аналогично опубликованным экспериментам с использованием dCas9 (каталитически неактивным вариантом Cas-9), РНК-узнающие Аргонавты можно использовать и для регуляции альтернативного сплайсинга, изменяя эффективность включения в зрелую мРНК определенных экзонов (рис. 5) [203].

Эволюция инструментов для редактирования генома шла от поиска и создания белков, способных узнавать конкретные последовательности ДНК (мегануклеазы, TALEN, нуклеазы на основе цинковых пальцев) к открытию универсальных программируемых нуклеаз, специфичность которых определяется гидовыми нуклеиновыми кислотами. К таким направляемым нуклеазам относятся ферменты на основе Cas-белков, которые активно используют в настоящее время для редактирования генов, а также белки-Аргонавты. Хотя пока не удалось достичь успехов в использовании Аргонавтов для редактирования геномов, их разнообразие, как структурное, так и функциональное, позволяет надеяться, что в скором времени они составят конкуренцию нуклеазам Cas.

В настоящее время исследования белков семейства Аргонавтов прокариот уже привели к практическому применению результатов данных работ – в формате новых высокочувствительных методов детекции нуклеиновых кислот, в том числе РНК SARS-CoV-2. В ближайшее время стоит ожидать появления работ с использованием Аргонавтов как эффективных инструментов для манипуляций с нуклеиновыми кислотами *in vitro*, а затем и *in vivo*, в том числе для редактирования геномных последовательностей.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 19-14-00359.

В работе не проводились эксперименты с использованием лабораторных животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. **596**(7873), 583–589.
2. Zhang B., Luo D., Li Y., Perčulija V., Chen J., Lin J., Ye Y., Ouyang S. (2021) Mechanistic insights into the R-loop formation and cleavage in CRISPR-Cas12i1. *Nat. Commun.* **12**(1), 3476.
3. Zhang Y., Zhang H., Xu X., Wang Y., Chen W., Wang Y., Wu Z., Tang N., Wang Y., Zhao S., Gan J., Ji Q. (2020) Catalytic-state structure and engineering of *Streptococcus thermophilus* Cas9. *Nat. Catal.* **3**(10), 813–823.
4. Hafez M., Hausner G. (2012) Homing endonucleases: DNA scissors on a mission. *Genome*. **55**(8), 553–569.
5. Paques F., Duchateau P. (2007) Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **7**(1), 49–66.
6. Jurica M.S., Monnat R.J., Stoddard B.L. (1998) DNA recognition and cleavage by the LAGLIDADG homing endonuclease I-Crel. *Mol. Cell*. **2**(4), 469–476.
7. McMurrough T.A., Brown C.M., Zhang K., Hausner G., Junop M.S., Gloor G.B., Edgell D.R. (2018) Active site residue identity regulates cleavage preference of LAGLIDADG homing endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **46**(22), 11990–12007.
8. Smith J., Grizot S., Arnould S., Duclert A., Epinat J.C., Chames P., Prieto J., Redondo P., Blanco F.J., Bravo J., Montoya G., Pâques F., Duchateau P. (2006) A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res.* **34**(22), e149.
9. Chevalier B.S., Kortemme T., Chadsey M.S., Baker D., Monnat R.J., Stoddard B.L. (2002) Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease. *Mol. Cell*. **10**(4), 895–905.
10. Li H., Pellenz S., Ulge U., Stoddard B.L., Monnat R.J. (2009) Generation of single-chain LAGLIDADG homing endonucleases from native homodimeric precursor proteins. *Nucleic Acids Res.* **37**(5), 1650–1662.
11. Kim Y.G., Chandrasegaran S. (1994) Chimeric restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**(3), 883–887.
12. Varshney G.K., Burgess S.M. (2016) DNA-guided genome editing using structure-guided endonucleases. *Genome Biol.* **17**(1), 187.
13. Xu S., Cao S., Zou B., Yue Y., Gu C., Chen X., Wang P., Dong X., Xiang Z., Li K., Zhu M., Zhao Q., Zhou G. (2016) An alternative novel tool for DNA editing with-

- out target sequence limitation: the structure-guided nuclease. *Genome Biol.* **17**(1), 186.
14. Miller J., McLachlan A.D., Klug A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4**(6), 1609–1614.
 15. Klug A. (2010) The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 213–231.
 16. Chandrasegaran S., Carroll D. (2016) Origins of programmable nucleases for genome engineering. *J. Mol. Biol.* **428**(5), 963–989.
 17. Pavletich N.P., Pabo C.O. (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science.* **252**(5007), 809–817.
 18. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**(3), 1156–1160.
 19. Shimizu Y., Şöllü C., Meckler J.F., Adriaenssens A., Zykovich A., Cathomen T., Segal D.J. (2011) Adding fingers to an engineered zinc finger nuclease can reduce activity. *Biochemistry.* **50**(22), 5033–5041.
 20. Bonas U., Stall R.E., Staskawicz B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *MGG Mol. Gen. Genet.* **218**(1), 127–136.
 21. Kay S., Hahn S., Marois E., Hause G., Bonas U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science.* **318**(5850), 648–651.
 22. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* **326**, 1509–1512.
 23. Moscou M.J., Bogdanove A.J. (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* **326**(5959), 1501.
 24. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics.* **186**(2), 757–761.
 25. Koonin E.V., Makarova K.S. (2019) Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R Soc. B Biol. Sci.* **374**(1772), 20180087.
 26. Jiang F., Doudna J.A. (2017) CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529.
 27. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* **339**(6121), 819–823.
 28. Jinek M., East A., Cheng A., Lin S., Ma E., Doudna J. (2013) RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife.* **2**, e00471.
 29. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* **339**(6121), 823–826.
 30. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* **337**(6096), 816–821.
 31. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* **156**(5), 935–949.
 32. Chatterjee P., Lee J., Nip L., Koseki S.R.T., Tysinger E., Sontheimer E.J., Jacobson J.M., Jakimo N. (2020) A Cas9 with PAM recognition for adenine dinucleotides. *Nat. Commun.* **11**(1), 2474.
 33. Ran F.A., Cong L., Yan W.X., Scott D.A., Gootenberg J.S., Kriz A.J., Zetsche B., Shalem O., Wu X., Makarova K.S., Koonin E.V., Sharp P.A., Zhang F. (2015) *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature.* **520**(7546), 186–191.
 34. Hu Z., Wang S., Zhang C., Gao N., Li M., Wang D., Wang D., Liu D., Liu H., Ong S.G., Wang H., Wang Y. (2020) A compact Cas9 ortholog from *Staphylococcus auricularis* (*Sauricas9*) expands the DNA targeting scope. *PLoS Biol.* **18**, e3000686.
 35. Karvelis T., Gasiunas G., Young J., Bigelyte G., Silanskas A., Cigan M., Siksnys V. (2015) Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements. *Genome Biol.* **16**(1), 253.
 36. Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P.W., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.R.J., Aryee M.J., Joung J.K. (2015) Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature.* **523**(7561), 481–485.
 37. Heler R., Wright A.V., Vucelja M., Bikard D., Doudna J.A., Marraffini L.A. (2017) Mutations in Cas9 enhance the rate of acquisition of viral spacer sequences during the CRISPR-Cas immune response. *Mol. Cell.* **65**(1), 168–175.
 38. Hu J.H., Miller S.M., Geurts M.H., Tang W., Chen L., Sun N., Zeina C.M., Gao X., Rees H.A., Lin Z., Liu D.R. (2018) Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature.* **556**(7699), 57–63.
 39. Nakade S., Yamamoto T., Sakuma T. (2017) Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3 – What's next? *Bioengineered.* **8**(3), 265–273.
 40. Ribeiro L.F., Ribeiro L.F.C., Barreto M.Q., Ward R.J. (2018) Protein engineering strategies to expand CRISPR-Cas9 applications. *Int. J. Genomics.* **2018**, 1652567.
 41. Tsai S.Q., Joung J.K. (2016) Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **17**(5), 300–312.
 42. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* **351**(6268), 84–88.
 43. Kim S., Kim D., Cho S.W., Kim J., Kim J.S. (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* **24**(6), 1012–1019.
 44. Maji B., Moore C.L., Zetsche B., Volz S.E., Zhang F., Shoulders M.D., Choudhary A. (2017) Multidimensional chemical control of CRISPR-Cas9. *Nat. Chem. Biol.* **13**(1), 9–11.

45. Davis K.M., Pattanayak V., Thompson D.B., Zuris J.A., Liu D.R. (2015) Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat. Chem. Biol.* **11**(5), 316–318.
46. Zetsche B., Volz S.E., Zhang F. (2015) A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat. Biotechnol.* **33**(2), 139–142.
47. Nihongaki Y., Kawano F., Nakajima T., Sato M. (2015) Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat. Biotechnol.* **33**(7), 755–760.
48. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* **163**(3), 759–771.
49. Paul B., Montoya G. (2020) CRISPR-Cas12a: functional overview and applications. *Biomed. J.* **43**(1), 8–17.
50. Li L., Li S., Wu N., Wu J., Wang G., Zhao G., Wang J. (2019) HOLMESv2: a CRISPR-Cas12b-assisted platform for nucleic acid detection and DNA methylation quantitation. *ACS Synth. Biol.* **8**(10), 2228–2237.
51. Chen J.S., Ma E., Harrington L.B., Da Costa M., Tian X., Palefsky J.M., Doudna J.A. (2018) CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science.* **360**(6387), 436–439.
52. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M., Cox D.B.T., Shmakov S., Makarova K.S., Semenova E., Minakhin L., Severinov K., Regev A., Lander E.S., Koonin E.V., Zhang F. (2016) C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science.* **353**(6299), 557–558.
53. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Essletzbichler P., Han S., Joung J., Belanto J.J., Verdine V., Cox D.B.T., Kellner M.J., Regev A., Lander E.S., Voytas D.F., Ting A.Y., Zhang F. (2017) RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature.* **550**(7675), 280–284.
54. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J., Zhang F. (2018) Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a and Csm6. *Science.* **360**(3687), 439–444.
55. Kellner M.J., Koob J.G., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Zhang F. (2019) SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat. Protoc.* **14**, 2986–3012.
56. Freije C.A., Sabeti P.C. (2021) Detect and destroy: CRISPR-based technologies for the response against viruses. *Cell Host Microbe.* **29**(5), 689–703.
57. Altae-Tran H., Kannan S., Demircioglu F.E., Oshiro R., Nety S.P., McKay L.J., Dlakić M., Inskeep W.P., Makarova K.S., Macrae R.K., Koonin E.V., Zhang F. (2021) The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases. *Science.* **374**(6563), 57–65.
58. Karvelis T., Druteika G., Bigelyte G., Budre K., Zedaveinyte R., Silanskas A., Kazlauskas D., Venclovas Č., Siksnys V. (2021) Transposon-associated TnpB is a programmable RNA-guided DNA endonuclease. *Nature.* **599**(7886), 692–696.
59. Makarova K.S., Wolf Y.I., van der Oost J., Koonin E.V. (2009) Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol. Direct.* **4**, 29.
60. Ryazansky S., Kulbachinskiy A., Aravin A.A. (2018) The expanded universe of prokaryotic Argonaute proteins. *MBio.* **9**(6), e01935–18.
61. Swarts D.C., Makarova K., Wang Y., Nakanishi K., Ketting R.F., Koonin E.V., Patel D.J., van der Oost J. (2014) The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**(9), 743–753.
62. Baulcombe D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature.* **431**(7006), 356–363.
63. Miesen P., Joosten J., van Rij R.P. (2016) PIWIs go viral: arbovirus-derived piRNAs in vector mosquitoes. *PLoS Pathog.* **12**(12), e1006017.
64. Miesen P., Ivens A., Buck A.H., van Rij R.P. (2016) Small RNA profiling in dengue virus 2-infected *Aedes* mosquito cells reveals viral piRNAs and novel host miRNAs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**(2), e0004452.
65. Mussabekova A., Daeffler L., Imler J.L. (2017) Innate and intrinsic antiviral immunity in *Drosophila*. *Cell Mol. Life Sci.* **74**(1), 2039–2054.
66. Pumplin N., Voinnet O. (2013) RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**(11), 745–760.
67. Hammond S.M., Boettcher S., Caudy A.A., Kobayashi R., Hannon G.J. (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science.* **293**(5532), 1146–1150.
68. Meister G. (2013) Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* **14**(7), 447–459.
69. Aravin A., Gaidatzis D., Pfeffer S., Lagos-Quintana M., Landgraf P., Iovino N., Morris P., Brownstein M.J., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Chien M., Russo J.J., Ju J., Sheridan R., Sander C., Zavolan M., Tuschl T. (2006) A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature.* **442**(7099), 203–207.
70. Brennecke J., Aravin A.A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R., Hannon G.J. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell.* **128**(6), 1089–1103.
71. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Lührmann R., Tuschl T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* **110**(5), 563–574.
72. Moazed D. (2009) Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature.* **457**(7228), 413–420.
73. Pratt A.J., MacRae I.J. (2009) The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J. Biol. Chem.* **284**(27), 17897–17901.
74. Hutvagner G., Simard M.J. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**(1), 22–32.
75. Tolia N.H., Joshua-Tor L. (2007) Slicer and the Argonautes. *Nat. Chem. Biol.* **3**(1), 36–43.

76. Vaucheret H. (2008) Plant Argonautes. *Trends Plant Sci.* **13**(7), 350–358.
77. Aravin A.A., Naumova N.M., Tulin A.V., Vagin V.V., Rozovsky Y.M., Gvozdev V.A. (2001) Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr. Biol.* **11**(13), 1017–1027.
78. Girard A., Sachidanandam R., Hannon G.J., Carmell M.A. (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature.* **442**(7099), 199–202.
79. Lau N.C., Seto A.G., Kim J., Kuramochi-Miyagawa S., Nakano T., Bartel D.P., Kingston R.E. (2006) Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science.* **313**(5785), 363–367.
80. Ma X., Zuo Z., Shao W., Jin Y., Meng Y. (2018) The expanding roles of Argonautes: RNA interference, splicing and beyond. *Brief Funct. Genomics.* **17**(3), 191–197.
81. Ghildiyal M., Zamore P.D. (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**(2), 94–108.
82. Liu W., Duttke S.H., Hetzel J., Groth M., Feng S., Gallego-Bartolome J., Zhong Z., Kuo H.Y., Wang Z., Zhai J., Chory J., Jacobsen S.E. (2018) RNA-directed DNA methylation involves co-transcriptional small RNA-guided slicing of Pol V transcripts in *Arabidopsis*. *Nat. Plants.* **4**(3), 181–188.
83. Olina A.V., Kulbachinskiy A.V., Aravin A.A., Esyunina D.M. (2018) Argonaute proteins and mechanisms of RNA interference in eukaryotes and prokaryotes. *Biochemistry (Mosc.)*. **83**(5), 483–497.
84. Pezic D., Manakov S.A., Sachidanandam R., Aravin A.A. (2014) piRNA pathway targets active LINE1 elements to establish the repressive H3K9me3 mark in germ cells. *Genes Dev.* **28**(13), 1410–1428.
85. Verdel A., Jia S., Gerber S., Sugiyama T., Gygi S., Grewal S.I.S., Moazed D. (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science.* **303**(5658), 672–676.
86. Ameres S.L., Martinez J., Schroeder R. (2007) Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell.* **130**(1), 101–112.
87. Aravin A.A., Klenov M.S., Vagin V.V., Bantignies F., Cavalli G., Gvozdev V.A. (2004) Dissection of a natural RNA silencing process in the *Drosophila melanogaster* germ line. *Mol. Cell Biol.* **24**(15), 6742–6750.
88. Denli A.M., Tops B.B.J., Plasterk R.H.A., Ketting R.F., Hannon G.J. (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* **432**(7014), 231–235.
89. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Rådmark O., Kim S., Kim V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* **425**(6956), 415–419.
90. Vagin V.V., Sigova A., Li C., Seitz H., Gvozdev V., Zamore P.D. (2006) A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science.* **313**(5785), 320–324.
91. Förstemann K., Horwich M.D., Wee L.M., Tomari Y., Zamore P.D. (2007) *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell.* **130**(2), 287–297.
92. Jinek M., Doudna J.A. (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature.* **457**(7228), 405–412.
93. Tomari Y., Du T., Zamore P.D. (2007) Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell.* **130**(2), 299–308.
94. Le Thomas A., Rogers A.K., Webster A., Marinov G.K., Liao S.E., Perkins E.M., Hur J.K., Aravin A.A., Tóth K.F. (2013) Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state. *Genes Dev.* **27**(4), 390–399.
95. Sienski G., Dönertas D., Brennecke J. (2012) Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell.* **151**(5), 964–980.
96. Czech B., Munafò M., Ciabrelli F., Eastwood E.L., Fabry M.H., Kneuss E., Hannon G.J. (2018) piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing. *Annu. Rev. Genet.* **52**, 131–157.
97. Webster A., Li S., Hur J.K., Wachsmuth M., Bois J.S., Perkins E.M., Patel D.J., Aravin A.A. (2015) Aub and Ago3 are recruited to nuage through two mechanisms to form a ping-pong complex assembled by Krimper. *Mol. Cell.* **59**(4), 564–575.
98. Bhattacharjee S., Roche B., Martienssen R.A. (2019) RNA-induced initiation of transcriptional silencing (RITS) complex structure and function. *RNA Biol.* **16**(9), 1133–1146.
99. Elkayam E., Kuhn C.D., Tocilj A., Haase A.D., Greene E.M., Hannon G.J., Joshua-Tor L. (2012) The structure of human Argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell.* **150**(1), 100–110.
100. Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Tuschl T., Patel D.J. (2008) Structure of an Argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature.* **456**(7224), 921–926.
101. Willkomm S., Oellig C.A., Zander A., Restle T., Keegan R., Grohmann D., Schneider S. (2017) Structural and mechanistic insights into an archaeal DNA-guided Argonaute protein. *Nat. Microbiol.* **2**, 17035.
102. Nakanishi K., Weinberg D.E., Bartel D.P., Patel D.J. (2012) Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature.* **486**(7403), 368–374.
103. Matsumoto N., Nishimasu H., Sakakibara K., Nishida K.M., Hirano T., Ishitani R., Siomi H., Siomi M.C., Nureki O. (2016) Crystal structure of silkworm PIWI-clade Argonaute Siwi bound to piRNA. *Cell.* **167**(2), 484–497. e9.
104. Schirle N.T., Sheu-Gruttadauria J., Chandradoss S.D., Joo C., MacRae I.J. (2015) Water-mediated recognition of t1-adenosine anchors Argonaute2 to microRNA targets. *eLife.* **4**, e07646.
105. Koonin E.V. (2017) Evolution of RNA- and DNA-guided antiviral defense systems in prokaryotes and eukaryotes: common ancestry vs convergence. *Biol. Direct.* **12**(1), 5.
106. Wang Y., Sheng G., Juranek S., Tuschl T., Patel D.J. (2008) Structure of the guide-strand-containing Argonaute silencing complex. *Nature.* **456**(7219), 209–213.

107. Willkomm S., Zander A., Grohmann D., Restle T. (2016) Mechanistic insights into archaeal and human Argonaute substrate binding and cleavage properties. *PLoS One*. **11**(10), e0164695.
108. Kwak P.B., Tomari Y. (2012) The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**(2), 145–151.
109. Parker J.S., Roe S.M., Barford D. (2004) Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.* **23**(24), 4727–4737.
110. Ma J.B., Yuan Y.R., Meister G., Pei Y., Tuschl T., Patel D.J. (2005) Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*. **434**(7033), 666–670.
111. Parker J.S., Roe S.M., Barford D. (2005) Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*. **434**(7033), 663–666.
112. Parker J.S., Parizotto E.A., Wang M., Roe S.M., Barford D. (2009) Enhancement of the seed-target recognition step in RNA silencing by a PIWI/MID domain protein. *Mol. Cell.* **33**(2), 204–214.
113. Yuan Y.R., Pei Y., Ma J.B., Kuryavii V., Zhadina M., Meister G., Chen H.Y., Dauter Z., Tuschl T., Patel D.J. (2005) Crystal structure of *A. aeolicus* Argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell.* **19**(3), 405–419.
114. Yuan Y.R., Pei Y., Chen H.Y., Tuschl T., Patel D.J. (2006) A potential protein-RNA recognition event along the RISC-loading pathway from the structure of *A. aeolicus* Argonaute with externally bound siRNA. *Structure*. **14**(10), 1557–1565.
115. Rashid U.J., Paterok D., Koglin A., Gohlke H., Piehler J., Chen J.C.H. (2007) Structure of *Aquifex aeolicus* Argonaute highlights conformational flexibility of the PAZ domain as a potential regulator of RNA-induced silencing complex function. *J. Biol. Chem.* **282**(18), 13824–13832.
116. Kuzmenko A., Oguienko A., Esyunina D., Yudin D., Petrova M., Kudinova A., Maslova O., Ninova M., Ryazansky S., Leach D., Aravin A.A., Kulbachinskiy A. (2020) DNA targeting and interference by a bacterial Argonaute nuclease. *Nature*. **587**(7835), 632–637.
117. Katoh K., Standley D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **30**(4), 772–780.
118. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **32**(1), 268–274.
119. Hoang D.T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B.Q., Vinh L.S. (2018) UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.* **35**(2), 518–522.
120. Kalyanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermini L.S. (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*. **14**(6), 587–589.
121. Hegge J.W., Swarts D.C., Chandradoss S.D., Cui T.J., Kneppers J., Jinek M., Joo C., van der Oost J. (2019) DNA-guided DNA cleavage at moderate temperatures by *Clostridium butyricum* Argonaute. *Nucleic Acids Res.* **47**(11), 5809–5821.
122. Kuzmenko A., Yudin D., Ryazansky S., Kulbachinskiy A., Aravin A.A. (2019) Programmable DNA cleavage by Ago nucleases from mesophilic bacteria *Clostridium butyricum* and *Limnithrix rosea*. *Nucleic Acids Res.* **47**(11), 5822–5836.
123. García-Quintans N., Bowden L., Berenguer J., Mencia M. (2019) DNA interference by a mesophilic Argonaute protein, CbcAgo. *F1000Res.* **8**, 321
124. Cao Y., Sun W., Wang J., Sheng G., Xiang G., Zhang T., Shi W., Li C., Wang Y., Zhao F., Wang H. (2019) Argonaute proteins from human gastrointestinal bacteria catalyze DNA-guided cleavage of single- and double-stranded DNA at 37°C. *Cell Discov.* **5**, 38.
125. Guo X., Sun Y., Chen L., Huang F., Liu Q., Feng Y. (2021) A hyperthermophilic Argonaute from *Ferroglobus placidus* with specificity on guide binding pattern. *Front. Microbiol.* **12**, 654345.
126. Kropocheva E., Kuzmenko A., Aravin A.A., Esyunina D., Kulbachinskiy A. (2021) A programmable pAgo nuclease with universal guide and target specificity from the mesophilic bacterium *Kurthia massiliensis*. *Nucleic Acids Res.* **49**(7), 4054–4065.
127. Liu Y., Li W., Jiang X., Wang Y., Zhang Z., Liu Q., He R., Chen Q., Yang J., Wang L., Wang F., Ma L. (2021) A programmable omnipotent Argonaute nuclease from mesophilic bacteria *Kurthia massiliensis*. *Nucleic Acids Res.* **49**(2), 1597–1608.
128. Chong Y., Liu Q., Huang F., Song D., Feng Y. (2019) Characterization of a recombinant thermotolerant Argonaute protein as an endonuclease by broad guide utilization. *Bioresour. Bioprocess.* **6**(1), 21.
129. Doxzen K.W., Doudna J.A. (2017) DNA recognition by an RNA-guided bacterial Argonaute. *PLoS One*. **12**(5), e0177097.
130. Kaya E., Doxzen K.W., Knoll K.R., Wilson R.C., Strutt S.C., Kranzusch P.J., Doudna J.A. (2016) A bacterial Argonaute with noncanonical guide RNA specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**(15), 4057–4062.
131. Lapinaite A., Doudna J.A., Cate J.H.D. (2018) Programmable RNA recognition using a CRISPR-associated Argonaute. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **115**(13), 3368–3373.
132. Zander A., Willkomm S., Ofer S., van Wolferen M., Egert L., Buchmeier S., Stöckl S., Tinnefeld P., Schneider S., Klingl A., Albers S.V., Werner F., Grohmann D. (2017) Guide-independent DNA cleavage by archaeal Argonaute from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Nat. Microbiol.* **2**, 17034.
133. Zander A., Holzmeister P., Klose D., Tinnefeld P., Grohmann D. (2014) Single-molecule FRET supports the two-state model of Argonaute action. *RNA Biol.* **11**(1), 45–56.
134. Fu L., Xie C., Jin Z., Tu Z., Han L., Jin M., Xiang Y., Zhang A. (2019) The prokaryotic Argonaute proteins enhance homology sequence-directed recombination in bacteria. *Nucleic Acids Res.* **47**(7), 3568–3579.
135. O'Geen H., Ren C., Coggins N.B., Bates S.L., Segal D.J. (2018) Unexpected binding behaviors of

- bacterial Argonautes in human cells cast doubts on their use as targetable gene regulators. *PLoS One*. **13**, e0193818.
136. Lao Y.H., Li M., Gao M.A., Shao D., Chi C.W., Huang D., Chakraborty S., Ho T.C., Jiang W., Wang H.X., Wang S., Leong K.W. (2018) HPV oncogene manipulation using nonvirally delivered CRISPR/Cas9 or *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Adv. Sci.* **5**(7), 1700540.
 137. Qi J., Dong Z., Shi Y., Wang X., Qin Y., Wang Y., Liu D. (2016) NgAgo-based *fabp11a* gene knockdown causes eye developmental defects in zebrafish. *Cell Res.* **26**(12), 1349–1352.
 138. Wu Z., Tan S., Xu L., Gao L., Zhu H., Ma C., Liang X. (2017) NgAgo-gDNA system efficiently suppresses hepatitis B virus replication through accelerating decay of pregenomic RNA. *Antiviral. Res.* **145**, 20–23.
 139. Rivas F.V., Tolia N.H., Song J.J., Aragon J.P., Liu J., Hannon G.J., Joshua-Tor L. (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**(4), 340–349.
 140. Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J., Joshua-Tor L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. **305**(5689), 1434–1437.
 141. Swarts D.C., Hegge J.W., Hinojo I., Shiimori M., Ellis M.A., Dumrongkulraksa J., Terns R.M., Terns M.P., van der Oost J. (2015) Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA. *Nucleic Acids Res.* **43**(10), 5120–5129.
 142. Olina A., Kuzmenko A., Ninova M., Aravin A.A., Kulbachinskiy A., Esyunina D. (2020) Genome-wide DNA sampling by Ago nuclease from the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *RNA Biol.* **17**(5), 677–688.
 143. Hunt E.A., Evans T.C.Jr., Tanner N.A. (2018) Single-stranded binding proteins and helicase enhance the activity of prokaryotic Argonautes *in vitro*. *PLoS One*. **13**, e0203073.
 144. Sheng G., Zhao H., Wang J., Rao Y., Tian W., Swarts D.C., van der Oost J., Patel D.J., Wang Y. (2014) Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**(2), 652–657.
 145. Swarts D.C., Szczepaniak M., Sheng G., Chandradoss S.D., Zhu Y., Timmers E.M., Zhang Y., Zhao H., Lou J., Wang Y., Joo C., van der Oost J. (2017) Autonomous generation and loading of DNA guides by bacterial Argonaute. *Mol. Cell.* **65**(6), 985–998.
 146. Swarts D.C., Jore M.M., Westra E.R., Zhu Y., Janssen J.H., Snijders A.P., Wang Y., Patel D.J., Berenguer J., Brouns S.J.J., van der Oost J. (2014) DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*. **507**(7491), 258–261.
 147. Swarts D.C., Koehorst J.J., Westra E.R., Schaap P.J., van der Oost J. (2015) Effects of Argonaute on gene expression in *Thermus thermophilus*. *PLoS One*. **10**, e0124880.
 148. Wang Y., Juranek S., Li H., Sheng G., Wardle G.S., Tuschl T., Patel D.J. (2009) Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature*. **461**(7265), 754–761.
 149. Jolly S.M., Gainetdinov I., Jouravleva K., Zhang H., Strittmatter L., Bailey S.M., Hendricks G.M., Dhabaria A., Ueberheide B., Zamore P.D. (2020) *Thermus thermophilus* Argonaute functions in the completion of DNA replication. *Cell*. **182**(6), 1545–1559.
 150. Park J.H., Shin S.Y., Shin C. (2017) Non-canonical targets destabilize microRNAs in human Argonautes. *Nucleic Acids Res.* **45**(4), 1569–1583.
 151. Salomon W.E., Jolly S.M., Moore M.J., Zamore P.D., Serebrov V. (2015) Single-molecule imaging reveals that Argonaute reshapes the binding properties of its nucleic acid guides. *Cell*. **162**(1), 84–95.
 152. Schirle N.T., Sheu-Gruttadauria J., MacRae I.J. (2014) Structural basis for microRNA targeting. *Science*. **346**(6209), 608–613.
 153. Dayeh D.M., Cantara W.A., Kitzrow J.P., Musier-Forsyth K., Nakanishi K. (2018) Argonaute-based programmable RNase as a tool for cleavage of highly-structured RNA. *Nucleic Acids Res.* **46**(16), e98.
 154. Anzeler T.A., Chowdhury S., Hughes S.M., Xiao Y., Lander G.C., MacRae I.J. (2021) Structural basis for piRNA targeting. *Nature*. **597**(7875), 285–289.
 155. Nishida K.M., Iwasaki Y.W., Murota Y., Nagao A., Mannen T., Kato Y., Siomi H., Siomi M.C. (2015) Respective functions of two distinct Siwi complexes assembled during PIWI-interacting RNA biogenesis in *Bombyx* germ cells. *Cell Rep.* **10**(2), 193–203.
 156. Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T. (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell.* **15**(2), 185–197.
 157. Schalk C., Cognat V., Graindorge S., Vincent T., Voinnet O., Molinier J. (2017) Small RNA-mediated repair of UV-induced DNA lesions by the DNA DAMAGE-BINDING PROTEIN 2 and ARGONAUTE 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**(14), 2965–2975.
 158. Liu Y., Esyunina D., Olovnikov I., Teplova M., Kulbachinskiy A., Aravin A.A., Patel D.J. (2018) Accommodation of helical imperfections in *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute ternary complexes with guide RNA and target DNA. *Cell Rep.* **24**(2), 453–462.
 159. Olovnikov I., Chan K., Sachidanandam R., Newman D.K., Aravin A.A. (2013) Bacterial Argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol. Cell.* **51**(5), 594–605.
 160. Globyte V., Kim S.H., Joo C. (2018) Single-molecule view of small RNA-guided target search and recognition. *Annu. Rev. Biophys.* **47**, 569–593.
 161. Klum S.M., Chandradoss S.D., Schirle N.T., Joo C., MacRae I.J. (2018) Helix-7 in Argonaute2 shapes the microRNA seed region for rapid target recognition. *EMBO J.* **37**(1), 75–88.
 162. Sheu-Gruttadauria J., MacRae I.J. (2017) Structural foundations of RNA silencing by Argonaute. *J. Mol. Biol.* **429**(17), 2619–2639.

163. Wee L.M., Flores-Jasso C.F., Salomon W.E., Zamore P.D. (2012) Argonaute divides its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. *Cell*. **151**(15), 1055–1067.
164. Willkomm S., Makarova K.S., Grohmann D. (2018) DNA silencing by prokaryotic Argonaute proteins adds a new layer of defense against invading nucleic acids. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**(3), 376–387.
165. Hur J.K., Zinchenko M.K., Djuranovic S., Green R. (2013) Regulation of Argonaute slicer activity by guide RNA 3' end interactions with the N-terminal lobe. *J. Biol. Chem.* **288**(11), 7829–7840.
166. Jung S.R., Kim E., Hwang W., Shin S., Song J.J., Hohng S. (2013) Dynamic anchoring of the 3'-end of the guide strand controls the target dissociation of Argonaute-guide complex. *J. Am. Chem. Soc.* **135**(45), 16865–16871.
167. Dahlgren C., Zhang H.Y., Du Q., Grahn M., Norstedt G., Wahlestedt C., Liang Z. (2008) Analysis of siRNA specificity on targets with double-nucleotide mismatches. *Nucleic Acids Res.* **36**(9), e53.
168. Lisitskaya L., Aravin A.A., Kulbachinskiy A. (2018) DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins. *Nat. Commun.* **9**(1), 5165.
169. Sheng G., Gogakos T., Wang J., Zhao H., Serganov A., Juranek S., Tuschl T., Patel D.J., Wang Y. (2017) Structure/cleavage-based insights into helical perturbations at bulge sites within *T. thermophilus* Argonaute silencing complexes. *Nucleic Acids Res.* **45**(15), 9149–9163.
170. Tal N., Sorek R. (2022) SnapShot: bacterial immunity. *Cell*. **185**(3), 578.
171. Payne L.J., Todeschini T.C., Wu Y., Perry B.J., Ronson C.W., Fineran P.C., Nobrega F.L., Jackson S.A. (2021) Identification and classification of antiviral defence systems in bacteria and archaea with PADLOC reveals new system types. *Nucleic Acids Res.* **49**(19), 10868–10878.
172. Tesson F., Hervé A., Mordret E., Touchon M., D'Humières C., Cury J., Bernheim A. (2022) Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes. *Nat. Commun.* **13**(1), 2561.
173. Rocha E.P.C., Bikard D. (2022) Microbial defenses against mobile genetic elements and viruses: who defends whom from what? *PLoS Biol.* **20**, e3001514.
174. Noto M.J., Kreiswirth B.N., Monk A.B., Archer G.L. (2008) Gene acquisition at the insertion site for SCCmec, the genomic island conferring methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **190**(4), 1276–1283.
175. Doron S., Melamed S., Ofir G., Leavitt A., Lopatina A., Keren M., Amitai G., Sorek R. (2018) Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. *Science*. **359**(6379), 1008–1009.
176. Rousset F., Depardieu F., Miele S., Dowding J., Laval A.-L., Lieberman E., Garry D., Rocha E.P.C., Bernheim A., Bikard D. (2022) Phages and their satellites encode hotspots of antiviral systems. *Cell Host Microbe*. **30**(5), 740–753. e5.
177. Ka D., Oh H., Park E., Kim J.H., Bae E. (2020) Structural and functional evidence of bacterial anti-phage protection by Thoeris defense system via NAD⁺ degradation. *Nat. Commun.* **11**(1), 28–16.
178. Ofir G., Herbst E., Baroz M., Cohen D., Millman A., Doron S., Tal N., Malheiro D.B.A., Malitsky S., Amitai G., Sorek R. (2021) Antiviral activity of bacterial TIR domains via signaling molecules that trigger cell death. *Nature*. **600**(7887), 116–120.
179. Koopal B., Potocnik A., Mutte S.K., Aparicio-Maldonado C., Lindhoud S., Vervoort J.J.M., Brouns S.J.J., Swarts D.C. (2022) Short prokaryotic Argonaute systems trigger cell death upon detection of invading DNA. *Cell*. **185**(9), 1471–1486.
180. He R., Wang L., Wang F., Li W., Liu Y., Li A., Wang Y., Mao W., Zhai C., Ma L. (2019) *Pyrococcus furiosus* Argonaute-mediated nucleic acid detection. *Chem. Commun. (Camb.)*. **55**(88), 13219–13222.
181. Wang L., He R., Lv B., Yu X., Liu Y., Yang J., Li W., Wang Y., Zhang H., Yan G., Mao W., Liu L., Wang F., Ma L. (2021) *Pyrococcus furiosus* Argonaute coupled with modified ligase chain reaction for detection of SARS-CoV-2 and HPV. *Talanta*. **227**, 122154.
182. Xiao G., Fu X., Zhang J., Liu S., Wang Z., Ye T., Zhang G. (2021) Rapid and cost-effective screening of CRISPR/Cas9-induced mutants by DNA-guided Argonaute nuclease. *Biotechnol. Lett.* **43**(11), 2105–2110.
183. Song J., Hegge J.W., Mauk M.G., Chen J., Till J.E., Bhagwat N., Azink L.T., Peng J., Sen M., Mays J., Carpenter E.L., van der Oost J., Bau H.H. (2020) Highly specific enrichment of rare nucleic acid fractions using *Thermus thermophilus* Argonaute with applications in cancer diagnostics. *Nucleic Acids Res.* **48**(4), e19.
184. Shin S., Jung Y., Uhm H., Song M., Son S., Goo J., Jeong C., Song J.-J., Kim V.N., Hohng S. (2020) Quantification of purified endogenous miRNAs with high sensitivity and specificity. *Nat. Commun.* **11**(1), 6033.
185. Enghiad B., Zhao H. (2017) Programmable DNA-guided artificial restriction enzymes. *ACS Synth. Biol.* **6**(5), 752–757.
186. Hunt E.A., Tamanaha E., Bonanno K., Cantor E.J., Tanner N.A. (2021) Profiling *Thermus thermophilus* Argonaute guide DNA sequence preferences by functional screening. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 670940.
187. Wang F., Yang J., He R., Yu X., Chen S., Liu Y., Wang L., Li A., Liu L., Zhai C., Ma L. (2021) PflA-based detection of SARS-CoV-2. *Biosens. Bioelectron.* **177**, 112932.
188. Filius M., Cui T.J., Ananth A.N., Docter M.W., Hegge J.W., van der Oost J., Joo C. (2020) High-speed super-resolution imaging using protein-assisted DNA-PAINT. *Nano Lett.* **20**(4), 2264–2270.
189. Gao F., Shen X.Z., Jiang F., Wu Y., Han C. (2016) DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat. Biotechnol.* **34**(7), 768–773.
190. Hegge J.W., Swarts D.C., van der Oost J. (2018) Prokaryotic argonaute proteins: novel genome-editing tools? *Nat. Rev. Microbiol.* **16**(1), 5–11.
191. Burgess S., Cheng L., Gu F., Huang J., Huang Z., Lin S., Li J., Li W., Qin W., Sun Y., Songyang Z., Wei W., Wu Q., Wang H., Wang X., Xiong J.W., Xi J.,

- Yang H., Zhou B., Zhang B. (2016) Questions about NgAgo. *Protein Cell*. **7**(12), 913–915.
192. Lee S., Turchiano G., Ata H., Nowsheen S., Romito M., Lou Z., Ryu S.M., Ekker S.C., Cathomen T., Kim J.S. (2016) Failure to detect DNA-guided genome editing using *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat. Biotechnol.* **35**(1), 17–18.
193. Cai M., Si Y., Zhang J., Tian Z., Du S. (2018) Zebrafish embryonic slow muscle is a rapid system for genetic analysis of sarcomere organization by CRISPR/Cas9, but not NgAgo. *Mar. Biotechnol.* **20**(2), 168–181.
194. Khin N.C., Lowe J.L., Jensen L.M., Burgio G. (2017) No evidence for genome editing in mouse zygotes and HEK293T human cell line using the DNA-guided *Natronobacterium gregoryi* Argonaute (NgAgo). *PLoS One*. **12**(6), e0178768.
195. Lee K.Z., Mechikoff M.A., Kikla A., Liu A., Pandolfi P., Fitzgerald K., Gimble F.S., Solomon K.V. (2021) NgAgo possesses guided DNA nicking activity. *Nucleic Acids Res.* **49**(17), 9926–9937.
196. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. **533**(7603), 420–424.
197. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. (2017) Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. **551**(7681), 464–471.
198. Waryah C.B., Moses C., Arooj M., Blancafort P. (2018) Zinc fingers, TALEs, and CRISPR systems: a comparison of tools for epigenome editing. *Methods Mol. Biol.* **1767**, 19–63.
199. Morgan S.L., Mariano N.C., Bermudez A., Arruda N.L., Wu F., Luo Y., Shankar G., Jia L., Chen H., Hu J.F., Hoffman A.R., Huang C.C., Pitteri S.J., Wang K.C. (2017) Manipulation of nuclear architecture through CRISPR-mediated chromosomal looping. *Nat. Commun.* **8**, 15993.
200. Pederson T. (2014) Repeated TALEs: visualizing DNA sequence localization and chromosome dynamics in live cells. *Nucleus*. **5**(1), 28–31.
201. Rauch S., He C., Dickinson B.C. (2018) Targeted m6A reader proteins to study epitranscriptomic regulation of single RNAs. *J. Am. Chem. Soc.* **140**(38), 11974–11981.
202. Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Franklin B., Kellner M.J., Joung J., Zhang F. (2017) RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science*. **358**(6366), 1019–1027.
203. Konermann S., Lotfy P., Brideau N.J., Oki J., Shokhirev M.N., Hsu P.D. (2018) Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*. **173**(3), 665–676.

Procaryotic Argonaute Proteins as a Tool for Biotechnology

E. V. Kropocheva¹, L. A. Lisitskaya¹, A. A. Agapov¹, A. A. Musabirov¹,
A. V. Kulbachinskiy¹, and D. M. Esyunina¹, *

¹Institute of Molecular Genetics of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: es_dar@inbox.ru

Programmable nucleases are the most important tool for targeted manipulations with the genes and genomes of both prokaryotes and eukaryotes. Since the end of the 20th century, many approaches have been developed for specific modification of the genome. The review briefly considers the advantages and disadvantages of the main genetic editors known to date. The main attention is paid to programmable nucleases from the family of procaryotic Argonaute proteins. Argonaute proteins can recognize and cleave DNA sequences using small complementary guide molecules and play an important role in protecting prokaryotic cells from invading DNA. Argonaute proteins have already found applications in biotechnology for targeted cleavage and detection of nucleic acids and can potentially be used for genome editing.

Keywords: programmable nucleases, Argonaute proteins, guide DNA, biosensors, genome editing

УДК 577.21

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ Cas9 В ДРОЖЖАХ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2022 г. Д. С. Спасская^а, *, А. И. Давлетшин^б, В. В. Тютяева^а,
К. А. Кулагин^б, Д. Г. Гарбуз^а, Д. С. Карпов^а

^аЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия
*e-mail: drspssk@gmail.com

Поступила в редакцию 16.05.2022 г.

После доработки 01.06.2022 г.

Принята к публикации 01.06.2022 г.

Ключевым компонентом революционной технологии редактирования генома с помощью CRISPR/Cas системы *Streptococcus pyogenes* служит мультидоменный белок SpCas9 (Cas9). Однако специфичность фермента Cas9 дикого типа недостаточно высока для редактирования больших геномов высших эукариот, что ограничивает реализацию потенциала геномного редактирования как в фундаментальной науке, так и в терапии генетических заболеваний. Основным способом получения более точных вариантов Cas9 служит мутагенез с последующей характеристикой мутантных белков в какой-либо тест-системе *in vitro* или *in vivo*. Описанные в литературе *in vitro* и некоторые *in vivo* тест-системы чаще всего трудозатратны и имеют ограничения по масштабированию, которое необходимо, в частности, для скрининга библиотек мутантных вариантов Cas9. С целью разработки простого метода для высокопроизводительного скрининга Cas9-мутантов *in vivo* мы охарактеризовали три тест-системы, использующие CRISPR/Cas9-опосредованную инактивацию репортерных генов *tsPurple*, *ADE2* и *URA3* в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* как в модельном объекте. В экспериментах измерили активности высокоточных форм evoCas9 и HiFiCas9 по отношению к белку дикого типа. Установлено, что наиболее валидным способом оценки активности Cas9 служит метод с инактивацией гена *ADE2*. В полученной тест-системе показана чувствительность высокоточных вариантов Cas9 к структуре хроматина. Предложенная тест-система может быть применима в разработке редакторов генома нового поколения.

Ключевые слова: Cas9, *URA3*, *ADE2*, редактирование генома, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S0026898422060209

Система адаптивного иммунитета бактерий и архей CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) десять лет назад получила новое применение в качестве удобного и простого в исполнении метода внесения мутаций в эукариотический геном [1]. Из всего разнообразия открытых к настоящему времени CRISPR-систем наиболее популярной и хорошо изученной остается система II типа, в которой белковый эффектор представлен одним мультифункциональным белком бактерии

Streptococcus pyogenes — SpCas9 (Cas9) ([2]. Целевая последовательность для Cas9 в геноме программируется исследователем с помощью короткого РНК-спейсера в составе направляющей РНК (гид-РНК) [3]. После распознавания целевого участка ДНК с помощью гид-РНК нуклеаза Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в ДНК, который активирует клеточные механизмы репарации ДНК по пути соединения негомологичных концов (NHEJ), а при наличии донорного фрагмента — по пути гомологичной рекомбинации [4].

Благодаря удобному “программированию” белок Cas9 стал использоваться в клинических исследованиях в качестве инструмента редактирования генома при терапии генетических заболеваний человека [5]. Однако клиническое применение Cas9 сильно ограничено относительно низкой точностью распознавания, проявляющейся в способности разрезать геномную ДНК при неполном

Сокращения: CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; Cas (CRISPR associated protein) — белок, ассоциированный с CRISPR; PAM (protospacer adjacent motif) — мотив, примыкающий к протоспейсеру; 5-FOA (5-Fluorooctotic acid) — 5-фтороротовая кислота; NHEJ (Non-Homologous End Joining) — путь репарации двухцепочечных разрывов ДНК по механизму соединения негомологичных концов.

совпадении со спейсером гид-РНК – вплоть до четырех и более неправильно спаренных оснований [6]. Именно этот механизм лежит в основе нецелевой активности Cas9, то есть способности вносить двухцепочечный разрез не только в нужный участок генома, но и в близкие по последовательности локусы, вызывая тем самым появление нежелательных мутаций [7]. Для повышения специфичности нуклеазы получено множество мутантных вариантов Cas9 – с использованием как случайного, так и рационального мутагенеза [8–14]. Однако замечено, что полученные варианты уступают в активности Cas9 дикого типа на ряде мишеней ДНК *in vivo* [12, 15], из чего следует вывод о необходимости дальнейшего совершенствования этого инструмента. При характеристике множества новых мутантных вариантов Cas9, полученных, например, методами белковой эволюции, возникает необходимость использования высокопроизводительного подхода. Оценка активности и специфичности вариантов Cas9 сводится к определению наличия мутаций в целевых и нецелевых последовательностях ДНК соответственно. Существует группа методов определения активности Cas9 *in vitro*, которые во многом повторяют существующие технологии детекции однонуклеотидных полиморфизмов: секвенирование, разные варианты полимеразной цепной реакции, анализ ампликонов методами построения кривых плавления гетеродуплексов, распознавания нуклеазами T7E1 и Surveyor и другие (подробно описаны в обзорах [16, 17]). Однако в протоколах всех этих методов предусмотрена очистка ДНК, причем из большого числа образцов. Еще более трудоемкие методы анализа нуклеазной активности Cas9 подразумевают очистку белка, синтез гид-РНК и сборку всех компонентов реакции в одной пробирке [18]. Однако следует учитывать, что *in vivo* в эукариотических клетках Cas9 имеет совершенно иной, чем в прокариотах и *in vitro*, профиль активности по отношению к целевым и нецелевым участкам, а также толерантности к неправильно спаренным основаниям между спейсером и ДНК-мишенью [19]. По-видимому, это связано с влиянием хроматина на активность Cas9 [20, 21]. По этой причине назрела необходимость в разработке простых и при этом высокопроизводительных методов для оценки активности и специфичности новых вариантов Cas9 в эукариотах. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* обладают структурой хроматина, близкой к высшим эукариотам, при этом они быстро растут, их легко культивировать, причем без особых затрат на оборудование и материалы. На твердой питательной среде они формируют из отдельных клеток колонии, что упрощает анализ отредактированных генов. Кроме того, клетки дрожжей *S. cerevisiae* могут быть использованы для сборки плазмидных конструкций системы

CRISPR/Cas9 методом рекомбинационного клонирования – благодаря наличию высокоактивной системы гомологичной рекомбинации [22, 23].

В представленной работе методом рекомбинационного клонирования получены дрожжевые плазмиды, экспрессирующие высокоточные варианты HiFiCas9 (HiFi – High Fidelity, высокоточный) и evoCas9 (evo – от evolutioned, эволюционированный), а также два мутантных варианта evoCas9, и оценена их активность в клетках дрожжей. В качестве тест-систем оценки активности вариантов Cas9 апробированы несколько дрожжевых моделей, использующих репортерные гены метаболизма урацила (*URA3*) и аденина (*ADE2*), а также ген искусственного хромобелка Tinsel (*tsPurple*) [24]. В тест-системе *ADE2* изучено влияние контекста хроматина на активность высокоточных форм Cas9.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и условия роста. Активность вариантов Cas9 оценивали в клетках штамма BY4741 *S. cerevisiae* (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) (“Euroscarf”, Германия) и его производного BY4741Δ*trp* (BY4741 *trp1::URA3*), несущего замену кодирующей области гена *TRP1* на кодирующую область гена *URA3*. Молекулярное клонирование проводили с использованием хемокомпетентных клеток штамма XL1Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*) (“Евроген”, Россия). Дрожжи трансформировали по стандартному протоколу с использованием ацетата лития [25]. Редактированные по гену *ADE2* колонии дрожжей выращивали на селективной среде, содержащей 6.7 г/л YNB (yeast nitrogen base w/o amino acids), 20 г/л глюкозы, 2 г/л смеси аминокислот (Drop-out mix) без лейцина, триптофана, гистидина и урацила, с добавлением гистидина и урацила в концентрации 100 мг/л и аденина в концентрации 1 мг/л. Колонии дрожжей, отредактированных по гену *URA3*, выращивали на селективной среде, содержащей 6.7 г/л YNB, 20 г/л глюкозы, 2 г/л Drop-out mix без лейцина, триптофана, гистидина и урацила, с добавлением гистидина и аденина в концентрации 100 мг/л. Колонии дрожжей штамма BY4741Δ*trp* – с заменой гена *URA3* на ген хромобелка Tinsel (*tsPurple*) – отбирали на искусственной селективной среде, содержащей 6.7 г/л YNB, 20 г/л глюкозы, 2 г/л Drop-out mix без урацила, с добавлением урацила до конечной концентрации 10 мкг/л и контрелективного агента 5-фторуровой кислоты (5-FOA) до конечной концентрации 1 мг/л. Все компоненты питательных сред производства “Sigma-Aldrich” (Германия).

Получение штамма, несущего репортерный ген хромобелка Tinsel. Экспрессионную кассету гена *tsPurple* с участками, комплементарными обла-

стям, фланкирующим ген *URA3* в штамме BY4741 Δ *trp*, амплифицировали с праймерами TRP1-Tinsel-rec-F и TRP1-Tinsel-rec-R (табл. 1) с плазмиды pTEF-Tinsel Purple (“ATUM”, США) (табл. 2). Полученным ПЦР-продуктом трансформировали штамм BY4741 Δ *trp*. Колонии дрожжевых трансформантов выращивали на искусственной селективной среде, содержащей контрольный селективный агент 5-FOA. Наличие вставки гена *tsPurple* в геномной ДНК рекомбинатных штаммов дрожжей проверяли с помощью праймеров

TRP-ch-F1 и Tinsel-ch-R. Полученный штамм назвали WT-Tinsel.

Клонирование спейсеров гид-РНК. Последовательности спейсеров против генов *URA3* и *ADE2* *S. cerevisiae* использовали из литературных данных или подбирали с помощью онлайн-сервиса CRISPOR [28] (табл. 3). Длинные олигонуклеотиды, кодирующие спейсеры ScURA-PRP-F, ADE2-lit-RPR-F или ADE2-1-RPR (табл. 1), клонировали в вектор pRPR1_gRNA_handle_RPR1t, разрезанный по сайтам HindIII, с использовани-

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

| Название | Последовательность (5' → 3') |
|------------------------|---|
| TRP1-URA3-rec-F | GTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTATGTCGAAAGCTACAT-ATAAGGAACG |
| TRP1-URA3-rec-R | AGTGCACAAACAATACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAACCTAGTTTTGCTGGCCG-CATCTTCTC |
| TRP-gn-ch-F | CAGATGGCAGTAGTGGAAGAT |
| TRP-gn-ch-R | GTAAAAGTCAACCCCTGCGATG |
| ADE2-lit-RPR-F* | GAGCTGCGATTGGCAGAAGCTT AATTGTAGAGACTATCCACAG TTTTAGAGCTAGAA-ATAGCAAG |
| ScURA-PRP-F* | GAGCTGCGATTGGCAGAAGCTT GAGTAAAAAATTGTA CTTGGGTTTTAGAGCTAGAA-ATAGCAAG |
| ADE2-1-RPR-F* | GAGCTGCGATTGGCAGAAGCTT AGTTACCCAAAGTGTTCCTG TTTTAGAGCTAGAA-ATAGCAAG |
| TRP1-Tinsel-rec-F | GTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTATGGCATCTTTAGTCA-AAAAGGATATGT |
| TRP1-Tinsel-rec-R | AGTGCACAAACAATACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAACCTAACCCAGTAGCCCTTC-TCAGGTAC |
| TRP-ch-F1 | GTAGTTATAAGAAAGAGACC |
| Tinsel-ch-R | GTGTACGTTCCCAAGTGAAGC |
| hCas9-NcoI-F | TACCAACAACCATGGACAAGAAGTACTCCATTGGG |
| hCas9-EcoRI-noNLS-R | CTCTCTCTTGAATTCAGCCCTGCTGTCTCCACCGAG |
| evo-Cas9-TEF1- M495V-F | CTGCCAGTCCCTTCATCGAAAGGGTGACCAACTTCGATAAGAACCTGC |
| evo-Cas9-TEF1- M495V-R | GCAGGTTCTTATCGAAGTTGGTCACCCTTTTCGATGAAGGACTGGGCAGAG |
| evo-Cas9-TEF1-R661Q-F | CGGAGATACACCGGCTGGGGCCAGCTGTCAAGAAAAGTCAATGGGAT |
| evo-Cas9-TEF1-R661Q-R | ATCCCATGATCAGTTTTCTTGACAGCTGGCCCCAGCCGGTGTATCTCCG |
| HiFi-Cas9-F | GTCCGATGGATTTGCCAACGCTAACTTCATGCAAG |
| HiFi-Cas9-R | GTCATCATGGATCAACTGCATGAAGTTAGCGTTGGCAA |
| TAG-ADE-for | GGTTTAGTGTTTTCTTACCCAATTGTATAGACTATCCACAAGACAATATTTG |
| TAG-ADE-rev | GAACGGAGTCCGGAACCTAGCAGGCGCATAACATAAGTCACAAATATTGTCTTGTG |
| ADE2-1,2-mut-F | AGAGCATTAAATCAAAAATGGTATAGCAGTTACCCAAAGTTGACCTGTAACAAGCCA-GTGAGACGTCCCT |
| ADE2-1,2-mut-R | AGTCCTCGACTTCAAGACGAATGGAAAACCCAAATCTCTTAACATTACAATAGGGAC-GTCTCACTGGCTT |
| URA-TEMPL-F | GATTTTTCCATGGAGGGCACAGTTAAGCCGCTAAAGGCATTATAAGCCAAGTAC |
| URA-TEMPL-R | GTATTACCAATGTCAGCAAATTTCTGTCTTTCGAAGAGTAAAAAATTGTACTTGGCT-TATAATGCC |

* Жирным шрифтом с подчеркиванием выделены последовательности спейсеров.

Таблица 2. Плазмиды, использованные в работе

| Название | Назначение | Источник |
|--------------------------|--|--------------------|
| p414-TEF1p-Cas9-CYC1t | Низкокопийная центромерная дрожжевая экспрессионная плаزمида, кодирующая Cas9 дикого типа (с оптимизированной под клетки человека экспрессией) | [26] |
| pRPR1_gRNA_handle_R-PR1t | Высококопийный (2μ) дрожжевой шаттл-вектор, кодирующий структурную часть гид-РНК | [27] |
| pTEF-Tinsel Purple | Высококопийный (2μ) дрожжевой вектор, экспрессирующий хромобелок Tinsel | ATUM (Newark, США) |
| pX-evoCas9 | Плазмида, экспрессирующая в клетках млекопитающих высокоточный вариант evoCas9 | [13] |
| p414-Cas9-PstI | Плазмида, производная от p414-TEF1p-Cas9-CYC1t, с удаленной внутренней частью гена <i>cas9</i> по сайтам PstI | Эта работа |
| pRPR1_gRNA_ADE2-lit | Вектор pRPR1_gRNA_handle_RPR1t, кодирующий гид-РНК со спейсером против гена <i>ADE2</i> | Эта работа |
| pRPR1_gRNA_ADE2-1 | Вектор pRPR1_gRNA_handle_RPR1t, кодирующий гид-РНК со спейсером-1 против гена <i>ADE2</i> | Эта работа |
| pRPR1_gRNA_URA3 | Вектор pRPR1_gRNA_handle_RPR1t, кодирующий гид-РНК против гена <i>URA3</i> | Эта работа |
| p414-evoCas9 | Плазмида p414-TEF1p-Cas9-CYC1t, экспрессирующая evoCas9 | Эта работа |
| p414-evoCas9 GR/VA | Плазмида p414-TEF1p-Cas9-CYC1t, экспрессирующая evoCas9 с нецелевыми заменами G453R и V856A | Эта работа |
| p414-HiFiCas9 | Плазмида p414-TEF1p-Cas9-CYC1t, экспрессирующая HiFiCas9 | Эта работа |

Таблица 3. Последовательности спейсеров гид-РНК против генов *URA3* и *ADE2*

| Название | Последовательность (5' → 3') | Источник |
|----------|------------------------------|------------|
| antiURA3 | GAGTAAAAAATTGTA CT TGG | [29] |
| ADE2-lit | AATTGTAGAGACTATCCACA | [30] |
| ADE2-1 | AGTTACCCAAAGTGTTCTG | Эта работа |

ем ферментативной сборки с набором Gibson Assembly Master Mix (“NEB”, США). Полученными смесями трансформировали штамм XL-blue1 *Escherichia coli*. Корректность полученных плазмид проверяли с помощью секвенирования.

Клонирование генов высокоточных вариантов Cas9. Плазмиды, кодирующие высокоточные формы Cas9 (evoCas9 и HiFiCas9), получали ранее описанным методом рекомбинационного клонирования [23]. Вкратце, ПЦР-фрагменты, несущие заданные мутации в гене *cas9* (evo-*cas9* [13] или HiFi-*cas9* [12]), амплифицировали с помощью высокоточной полимеразы КАРА-HiFi (“Roche”, Швейцария) согласно табл. 4. Плазмиду p414-Cas9-PstI линейаризовали по сайту PstI, объединяли с полученными ПЦР-фрагментами, трансформировали в штамм BY4741Δ*trp* *S. cerevisiae* и растили на селективной среде без триптофана. Из отдельных колоний выделяли суммарную ДНК и трансформировали компетентные клетки *E. coli*

штамма XL-blue1. Правильность сборки плазмид проверяли при помощи ПЦР с колоний *E. coli*. Из отобранных колоний выделяли плазмидную ДНК и проверяли наличие целевых мутаций и отсутствие иных мутаций в генах *cas9* путем секвенирования.

Редактирование целевых генов дрожжей. Штамм BY4741Δ*trp* *S. cerevisiae* трансформировали смесью плазмид (по 1 мкг каждой), кодирующих мутантную форму Cas9 и гид-РНК; также смесь содержала донорный фрагмент ДНК (0.5 мкг) для репарации двухцепочечного разрыва, вносимого Cas9-нуклеазой, и введения стоп-кодона в белоккодирующую последовательность целевого гена. Донорные фрагменты получали путем отжига и достройки пар олигонуклеотидов TAG-ADE-for/TAG-ADE-rev и ADE2-1,2-mut-F/ADE2-1,2-mut-R для инактивации гена *ADE2* и URA-TEMPL-F/URA-TEMPL-R для инактивации гена *URA3*.

Таблица 4. ПЦР-фрагменты, использованные при рекомбинационном клонировании генов высокоточных вариантов *evoCas9* и *HiFiCas9*

| Целевая плаزمид | Праймеры | Матрица | Размер ПЦР-продукта, п.н. |
|-----------------------|---|-----------------------|---------------------------|
| p414- <i>evoCas9</i> | hCas9-NcoI-F; evo-Cas9-TEF1- M495V-R | p414-TEF1p-Cas9-CYC1t | 1518 |
| p414- <i>evoCas9</i> | evo-Cas9-TEF1-M495V-F; evo-Cas9-TEF1-R661Q-R | pX- <i>evoCas9</i> | 552 |
| p414- <i>evoCas9</i> | evo-Cas9-TEF1-R661Q-F; hCas9-EcoRI-noNLS-R | p414-TEF1p-Cas9-CYC1t | 2169 |
| p414- <i>HiFiCas9</i> | hCas9-NcoI-F; HiFi-Cas9-R | p414-TEF1p-Cas9-CYC1t | 2111 |
| p414- <i>HiFiCas9</i> | HiFi-Cas9-F; hCas9-EcoRI-noNLS-R | p414-TEF1p-Cas9-CYC1t | 2077 |

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Использование *URA3* в качестве репортерного гена в тест-системе для оценки активности *Cas9*

Ключевой момент при создании тест-системы по оценке активности *Cas9* – выбор репортерного гена, по эффективности редактирования которого можно судить об активности этой нуклеазы. В генетических манипуляциях с дрожжами *S. cerevisiae* часто используют ауксотрофные маркеры – как правило, это гены метаболизма аминокислот и нуклеотидов [31]. Одним из наиболее часто используемых ауксотрофных маркеров служит ген биосинтеза пиримидиновых оснований *URA3*, кодирующий оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу. Инактивация *URA3* под действием какого-либо мутагена ведет к неспособности клеток формировать колонии на питательной среде без урацила. Таким образом, представляется разумным создание тест-системы, в которой активность *Cas9* обратно пропорциональна количеству колоний мутантных дрожжей, выросших на селективной среде, не содержащей урацила. Схема эксперимента по оценке нуклеазной активности *Cas9* относительно гена *URA3* представлена на рис. 1а. После котрансформации гаплоидного штамма BY4741 Δtrp , ауксотрофного по триптофану и лейцину (для поддержания плазмид, кодирующих *Cas9* и гид-РНК соответственно) и прототрофного по урацилу (интактный ген *URA3*), с помощью плазмид p414-TEF1p-Cas9-CYC1t и pRPR1_gRNA_ADE2-lit (табл. 2) колонии выращивали на селективной питательной среде, содержащей или не содержащей урацил. В трансформации дрожжей использовали также короткий донорный фрагмент длиной 100 п.н., вносящий стоп-кодон внутри рамки считывания гена *URA3*. Ожидали, что *Cas9* за счет спейсера anti-*URA3* распознает мишень в гене *URA3* и внесет двухцепочечный разрыв. В ходе репарации повреждения ДНК клеточные системы будут преимущественно использовать донорный фрагмент [32, 33], что приведет к инактивации ге-

на *URA3* из-за стоп-кодона в доноре. В случае высокоактивного варианта *Cas9* ожидали полную инактивацию *URA3* и, как следствие, формирование лишь незначительного числа колоний или их полное отсутствие. В случае слабоактивного варианта *Cas9* ожидали, что клетки уклонятся от действия нуклеазы, это приведет к сохранению последовательности *URA3* и формированию относительно большого числа колоний.

Согласно результатам, полученным в случае *Cas9* дикого типа (рис. 1б), при выращивании колоний в отсутствие гид-РНК образуется несколько сотен колоний (в среднем 760 ± 244 и 498 ± 314 на среде с добавлением и без урацила соответственно). В присутствии гид-РНК, но в отсутствие донора из-за *Cas9*-опосредованного повреждения гена *URA3* наблюдается формирование единичных колоний или их полное отсутствие, что подтверждает летальность двухцепочечных разрывов, вызванных *Cas9*, для гаплоидного штамма, используемого в экспериментах. В присутствии одновременно *Cas9*, гид-РНК и донора наблюдаются различия в количестве выросших колоний в зависимости от того, присутствует ли в питательной среде урацил или нет: наименьшее число колоний образуется на среде без добавления урацила и несколько десятков колоний вырастает на среде с урацилом. Полученные результаты можно объяснить тем, что донор, нейтрализуя негативный эффект двухцепочечного разрыва, вносимого *Cas9*, все равно инактивирует ген *URA3* из-за стоп-кодона. Отсюда понятно, что на питательной среде без урацила наличие донора в любом случае не способствует выживанию дрожжей, а на среде с урацилом донор способствует выживанию дрожжей за счет снижения токсичности двухцепочечных разрывов. С целью повысить зависимость образования колоний именно от активности *Cas9* в следующем эксперименте дрожжевые трансформанты растили на питательной среде без урацила.

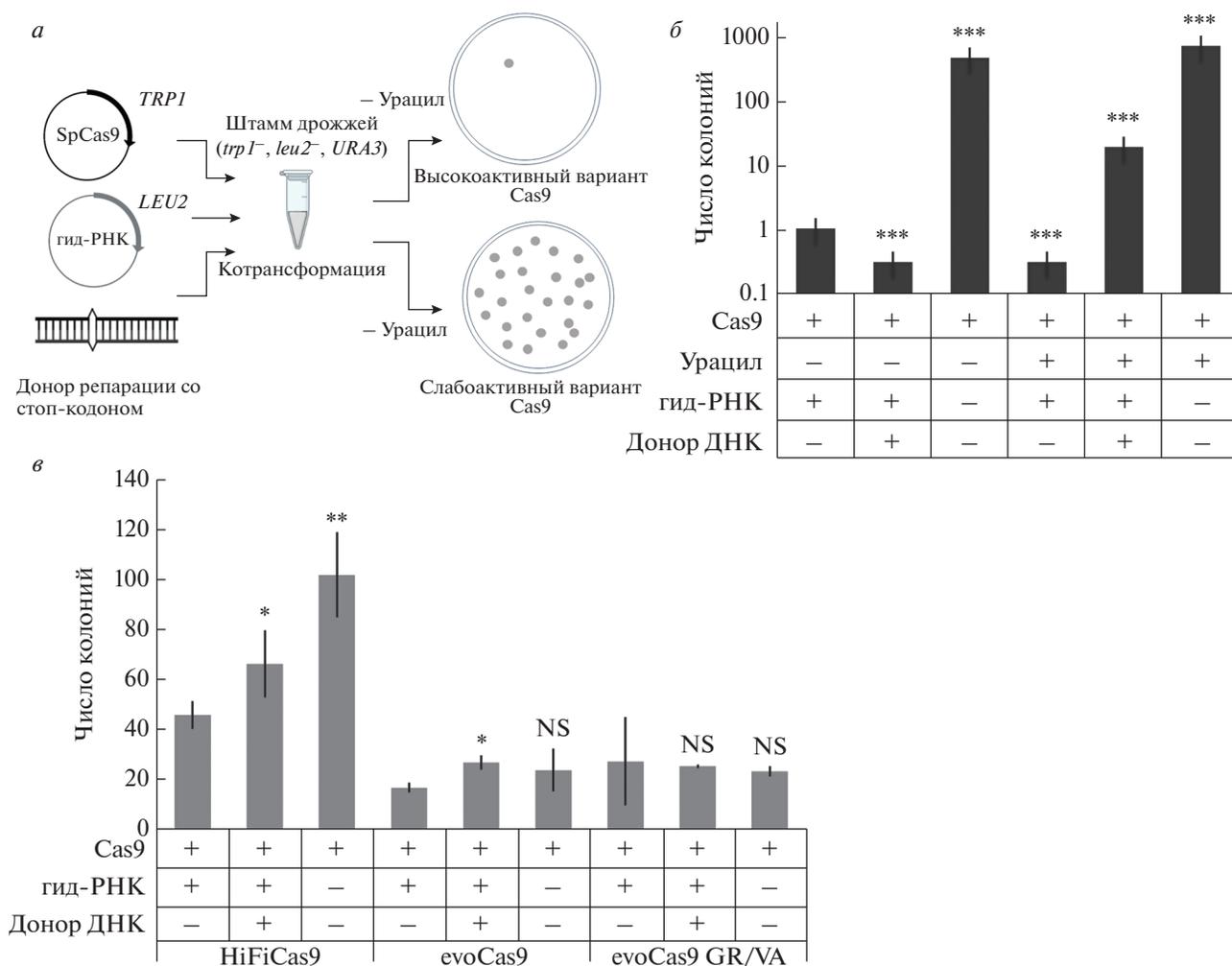


Рис. 1. Использование *URA3* в качестве репортерного гена в тест-системе для оценки активности вариантов Cas9. *а* – Схема эксперимента. *б* – Оценка активности Cas9 дикого типа в тест-системе с *URA3*. *в* – Оценка активности высокоточных вариантов Cas9 в тест-системе с *URA3*. Данные представлены в виде среднего в трех независимых экспериментах. Разброс представлен стандартным отклонением. Статистическая значимость различий в средних определена с помощью *t*-критерия Стьюдента: NS – статистически незначимые различия, * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$, *** $p < 0.001$.

В тест-системе оценили активность высокоточных производных Cas9, таких как HiFiCas9 и evoCas9, а также мутантного варианта – evoCas9 GR/VA – с нецелевыми заменами G453R и V856A, полученного в результате случайного мутагенеза. В этом случае даже в отсутствие гид-РНК наблюдалась низкая эффективность трансформации дрожжей (порядка 20–30 колоний, рис. 1в). В случае вариантов evoCas9 не обнаружено существенной зависимости образования колоний от наличия гид-РНК и донора. В случае варианта HiFiCas9 наблюдали статистически значимое снижение числа колоний в присутствии Cas9 и гид-РНК. Отметим, что образовавшихся колоний было примерно на порядок меньше, чем в случае нуклеазы дикого типа, из чего можно сделать вывод о сниженной активности HiFiCas9 по сравнению с Cas9.

Можно заключить, что тест-система с репортерным геном *URA3* позволяет исследовать зависимость колониеобразования от активности исследуемых вариантов Cas9, но она может быть искажена возможной более или менее высокой цитотоксичностью разных вариантов Cas9. Следовательно, подобная тест-система не может служить инструментом для адекватной оценки нуклеазной активности различных вариантов Cas9.

Использование гена хромобелка *Tinsel* в качестве репортерного в тест-системе для оценки активности Cas9

Наиболее адекватными тест-системами для оценки активности вариантов Cas9 считают такие, в которых при редактировании репортерных генов происходит изменение окраски дрожжевых

колоний. В подобных системах активность проверяемых вариантов Cas9 оценивают не по общему числу колоний, а по доле колоний с измененной окраской, тем самым нивелируя влияние побочных факторов, понижающих жизнеспособность дрожжевых колоний. Чтобы снизить потенциальную цитотоксичность, связанную с нарушением функций внутренних дрожжевых генов, в качестве цветного репортера выбрали искусственный ген, кодирующий пурпурный белок Tinsel, или tsPurple, который при экспрессии с высококопийной плазмиды под контролем сильного промотора гена *TEF1* окрашивает дрожжевые колонии в розовый цвет (*данные не приведены*). Мы предположили, что инактивация гена *tsPurple* при Cas9-опосредуемом мутагенезе приведет к исчезновению розовой окраски колонии. Использование гена *tsPurple* в составе высококопийной плазмиды, скорее всего, даст ложнонегативные результаты, что обусловлено инактивацией лишь части копий репортерного гена. На основании вышеизложенного мы получили штамм WT-Tinsel (производный от BY4741 Δ *trp*) с одной копией гена *tsPurple*, находящейся под контролем промотора гена *TEF1* и встроенной в локус *TRP1* вместо гена *URA3*. Однако у полученного штамма WT-Tinsel розового окрашивания колоний не наблюдали. По-видимому, при снижении числа копий гена хромобелок не накапливается в количестве, достаточном для окрашивания колонии. Следовательно, бактериальный хромобелок Tinsel не может служить надежным репортером в этой системе.

Использование ADE2 в качестве репортерного гена в тест-системе для оценки активности Cas9

Более надежным способом влияния на окраску дрожжевых колоний может быть использование ферментов. С этой целью наиболее часто используется путь *de novo* биосинтеза пуринов [34]. Нарушение функционирования фермента, кодируемого геном *ADE2*, ведет к накоплению пигмента, окрашивающего дрожжевые колонии в красный цвет. *ADE2* не важен для жизнедеятельности дрожжей и его полная инактивация ведет к ауксотрофности по аденину. Отметим, что в первой работе, где была продемонстрирована применимость системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома *S. cerevisiae*, одной из мишеней служил ген *ADE2* [26].

В тест-системе, использующей *ADE2* в качестве репортера, мерой активности Cas9 служит доля красных колоний: чем она выше, тем более активен исследуемый вариант нуклеазы (рис. 2а). Наиболее эффективный спейсер против *ADE2* был выбран в ходе сравнения результатов экспериментов по редактированию *ADE2*, описанных в литературе [26, 29, 35, 36]. Кроме того, последовательности спейсеров анализировали с помощью

программы CRISPOR [28] и учитывали возможное влияние структуры хроматина, используя данные о картировании положения нуклеосом в *S. cerevisiae* [37]. Наиболее эффективный спейсер обозначили как ADE2-lit (см. табл. 3). Помимо ADE2-lit выполнили дизайн менее эффективного спейсера, обозначенного как ADE2-1. Как и в случае тест-системы с *URA3*, при редактировании использовали донорные фрагменты ДНК, вносящие стоп-кодона, а также сдвиг рамки считывания -1 (в качестве PAM-блокирующей мутации) в участок Cas9-мишени в гене *ADE2*.

На рис. 2б представлены фотографии чашек Петри с колониями дрожжей, отредактированными по гену *ADE2* с использованием Cas9 дикого типа (правая панель) и высокоточного варианта evoCas9 (левая панель). Можно отметить, что в случае белка дикого типа доля красных колоний значительно выше, чем для evoCas9. Кроме того, воспроизводимо наблюдали, что в случае слабоактивных вариантов: evoCas9 и evoCas9 GR/VA — образуется в десятки раз больше колоний, чем для более активных HiFiCas9 и Cas9. Это указывает на высокую цитотоксичность активных вариантов, по-видимому, благодаря их способности эффективно вносить двухщепочечные разрывы ДНК — как целевые, так и нецелевые. Количественные данные по доле красных колоний представлены на рис. 2в. Согласно полученным результатам, средняя активность Cas9 в тест-системе *ADE2* составляет $83.0 \pm 7.8\%$, пониженный уровень зарегистрирован для HiFiCas9 — $52.2 \pm 3.9\%$, тогда как минимальную активность, как и в случае с тест-системой *URA3*, проявляют evoCas9 и evoCas9 GR/VA: 0.28 и 0.23% соответственно. В ходе секвенирования отредактированных участков *ADE2* во всех шести проверенных красных колониях обнаружены целевые нонсенс-мутации: замена кодона 211, кодирующего остаток глутаминовой кислоты, на стоп-кодон TAG и делеция G в мотиве PAM, которая ведет к сдвигу -1 рамки считывания в *ADE2*. В то же время во всех проверенных белых колониях обнаружена последовательность дикого типа.

На основании полученных результатов можно предположить, что низкая активность Cas9-редакторов дает возможность клеткам избежать действия системы CRISPR/Cas9. Кроме того, обращает на себя внимание относительно невысокий разброс в данных между повторами экспериментов в сравнении с разбросами, полученными в системе с геном *URA3*. По-видимому, доля окрашенных колоний как мера оценки активности Cas9 более устойчива к колебаниям общего числа образовавшихся колоний. Таким образом, тест-система с геном *ADE2* позволяет более надежно и адекватно оценивать активность Cas9-редакторов по сравнению с другими исследованными нами репортерными генами.

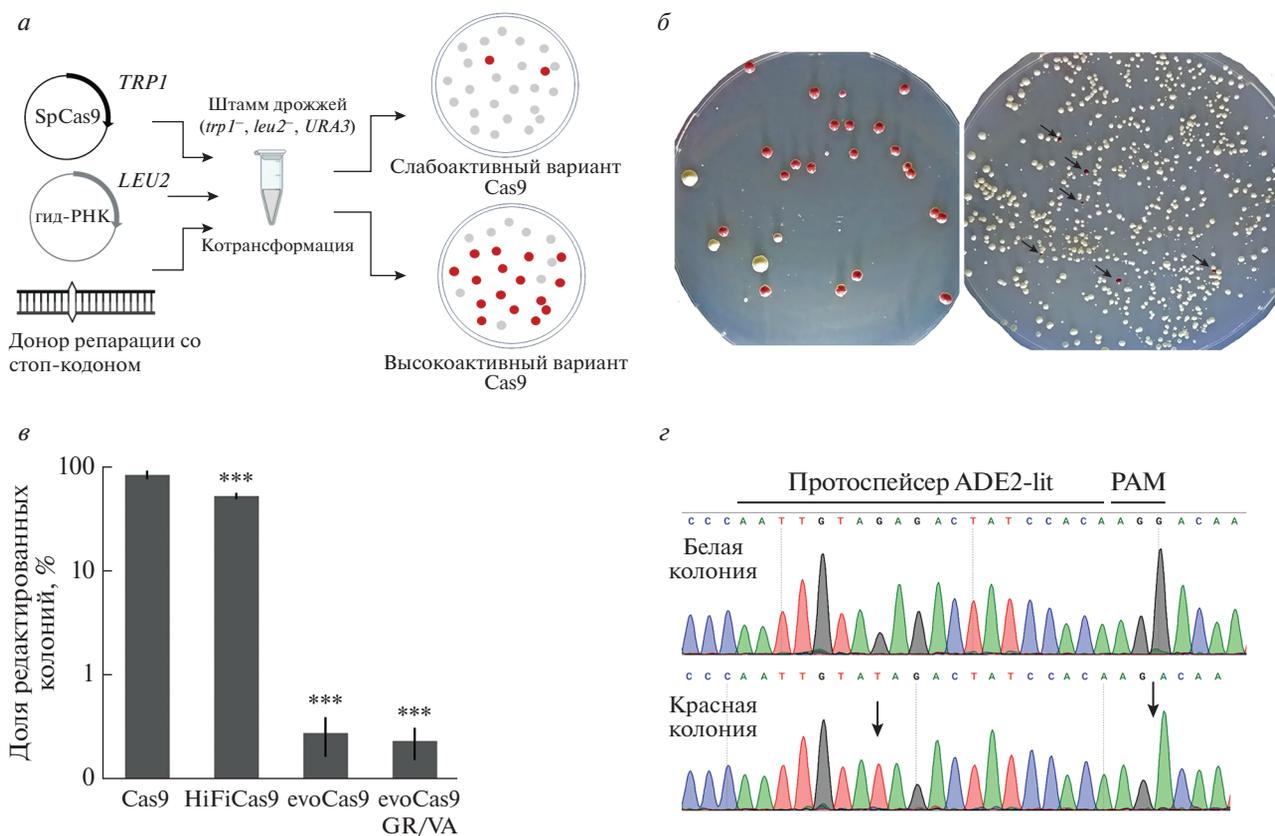


Рис. 2. Оценка активности вариантов Cas9 с использованием высокоэффективного спейсера против *ADE2*. *а* – Схема эксперимента. *б* – Оценка активности вариантов Cas9 с высокоэффективным спейсером ADE2-lit. Данные представлены в виде среднего для трех независимых экспериментов. Разброс представлен стандартным отклонением. Статистическая значимость различий в средних определена с помощью *t*-критерия Стьюдента: *** $p < 0.001$. *в* – Оценка активности вариантов Cas9 с высокоэффективным спейсером ADE2-lit. Данные представлены в виде среднего для трех независимых экспериментов. Разброс представлен стандартным отклонением. Статистическая значимость различий в средних определена с помощью *t*-критерия Стьюдента: *** $p < 0.001$. *г* – Репрезентативные фотографии чашек Петри с колониями дрожжей, редактированными Cas9 дикого типа (правое фото) и evoCas9 (левое фото, стрелками указаны красные колонии). *д* – Сравнение последовательностей ДНК в мишени *ADE2* в белой и красной колониях. Стрелками указаны положения мутаций: замена G→T, приводящая к изменению кодона Glu на стоп-кодон TAG, и делеция G в мотиве PAM, блокирующая дальнейшее действие Cas9 на отредактированный участок.

Эффективность спейсера зависит от положения относительно нуклеосом в редактируемом гене

Помимо высокоэффективного спейсера ADE2-lit в оценке активности вариантов Cas9 использовали второй спейсер, обозначенный как ADE2-1. Ожидалось, что эффективность этого спейсера будет ниже ADE2-lit, так как он находится близко от центра +3 нуклеосомы ADE2, в то время как ADE2-lit – на краю +5 нуклеосомы, которая к тому же слабее ассоциирована с ДНК, чем +3 нуклеосома (рис. 3а).

Согласно полученным результатам, все варианты Cas9 проявляют пониженную активность в отношении спейсера ADE2-1 (рис. 3б). Средняя активность Cas9 составила $71.0 \pm 15.0\%$, то есть снизилась по сравнению со спейсером ADE2-lit на 12%; активность HiFiCas9 снизилась в 6.3 раза и составила $8.3 \pm 1.1\%$, а evoCas9 и evoCas9 GR/VA – в

4.7 и 3.3 раза соответственно, составив 0.06 и 0.07%. На основании полученных данных можно говорить об относительно слабом влиянии нуклеосом на активность Cas9 дикого типа и сильном негативном влиянии нуклеосом на активность его высокоточных производных. Таким образом, тест-система с геном *ADE2* дает возможность детально исследовать влияние структуры хроматина на активность вариантов Cas9.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках создания дрожжевой тест-системы для оценки активности вариантов нуклеазы Cas9 в качестве репортерных генов охарактеризованы гены метаболизма урацила (*URA3*) и аденина (*ADE2*), а также ген искусственного хромобелка Tinsel (*tsPurple*). Полученные результаты указывают на надежность и адекватность тест-системы с

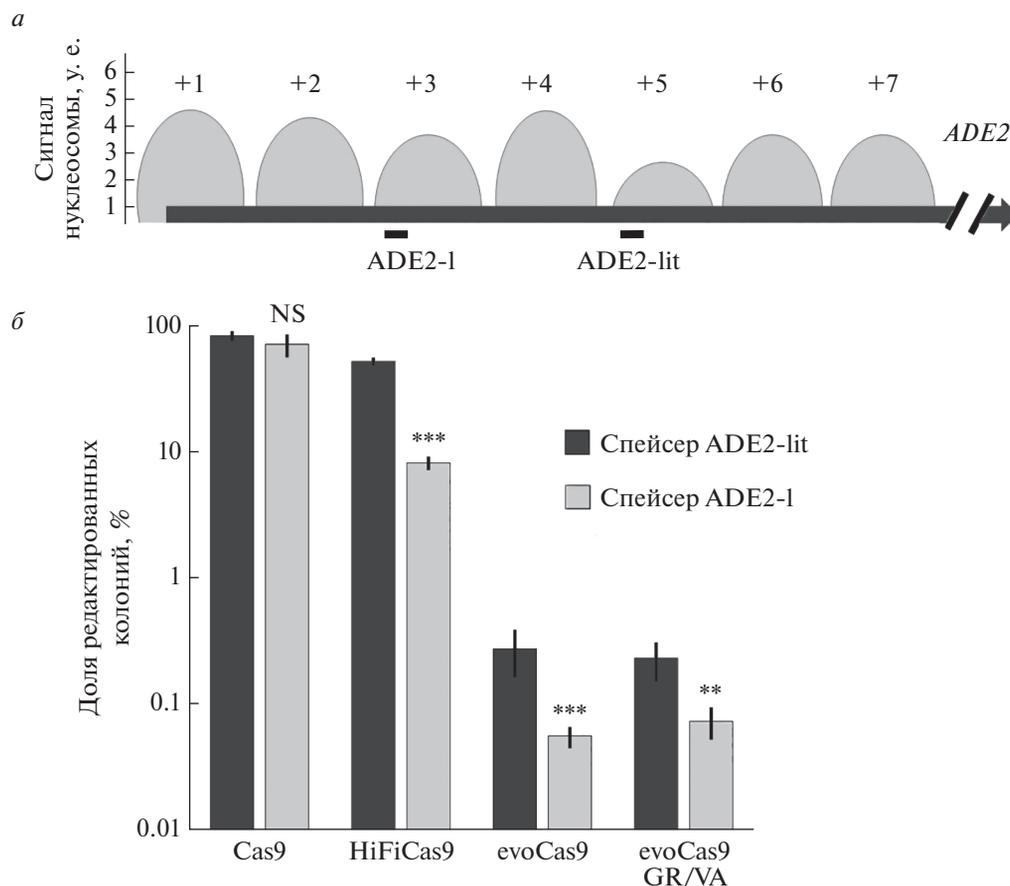


Рис. 3. Положение спейсеров относительно нуклеосом влияет на эффективность редактирования *ADE2*. *а* – Схема расположения первых 7 нуклеосом в кодирующей области гена *ADE2*. По оси ординат отложен уровень сигнала, полученного путем выделения и секвенирования нуклеосомной ДНК, который прямо пропорционален силе взаимодействия гистоновый октамер с нуклеосомной ДНК [37]. Высота схематично изображенных нуклеосом отражает уровень этого сигнала. Показано расположение спейсеров ADE2-1 и ADE2-lit относительно нуклеосом. *б* – Оценка активности вариантов Cas9 с использованием спейсеров ADE2-lit и ADE2-1. Статистическая значимость различий в средних определена с помощью *t*-критерия Стьюдента: NS – различия статистически незначимы, $0.01 > p > 0.001$, $***p < 0.001$.

геном *ADE2*. В полученной тест-системе показано негативное влияние структуры хроматина на активность высокоточных производных Cas9.

В настоящее время разработано несколько тест-систем для оценки активности мутантных производных Cas9 *in vivo* в различных организмах. Так, в клетках млекопитающих в качестве репортеров используют флуоресцентные белки и оценивают активность вариантов Cas9 по снижению интенсивности свечения в редактируемых клетках [38]. Интересен пример тест-системы с конверсией зеленого флуоресцентного белка в синий (за счет внесения замены Y66H), в которой методом проточной цитометрии оценивают долю клеток с конвертированным флуоресцентным белком [39, 40]. Следует отметить, что у млекопитающих система репарации двухцепочечных разрывов ДНК по механизму NHEJ на порядок активнее, чем система гомологичной рекомбина-

ции [41], поэтому и доля редактированных клеток с конвертированным флуоресцентным белком обычно небольшая (около 10%), а доля клеток с репортерным геном, поврежденным системой NHEJ, в несколько раз выше. Следовательно, подобная тест-система очень чувствительна к уровню активности системы гомологичной рекомбинации. Кроме того, использование репортерных систем млекопитающих с флуоресцентными белками требует применения дорогостоящего оборудования и подобные системы хорошо подходят для анализа активности единичных белков, но теряют эффективность при масштабировании задачи.

Масштабный анализ мутантных вариантов Cas9 впервые реализован в системе двойной селекции *E. coli* при получении Cas9 с измененной PAM-специфичностью [42], а также более точного варианта HiFiCas9 [12]. В этой системе *E. coli* трансформировали библиотекой плазмид, коди-

рующих мутантные варианты Cas9. Вырастали только те колонии, в которых за счет высокой целевой активности нуклеазы Cas9 инактивировала плазмиду, несущую ген токсина (*ccdB*), а за счет высокой специфичности не повреждала плазмиду с геном устойчивости к антибиотику карбеницилину. Однако у бактерий, в отличие от эукариот, отсутствует выраженная структура хроматина, поэтому невозможен отбор вариантов Cas9 по увеличению активности в контексте хроматина. В связи с этим важно подчеркнуть, что в разработанной нами системе HiFiCas9 обладает выраженной чувствительностью к структуре хроматина.

Аналогичная высокопроизводительная система двойной селекции библиотеки мутантных вариантов Cas9 реализована в клетках *S. cerevisiae* при получении высокоточной формы evoCas9 [13]. В этой системе активность мутантов Cas9 оценивали по восстановлению прототрофности к триптофану за счет Cas9-индуцируемой репарации поврежденного гена *TRP1* по механизму гомологичной рекомбинации. Специфичность оценивали по доле красных колоний, формирующихся при использовании Cas9 мутантами несовершенных спейсеров, отличающихся на один нуклеотид от мишени в гене *ADE2*. Следует отметить, что отбор вариантов Cas9 по признаку выживаемости колоний (как нами показано в случае гена *URA3*) не может служить надежным способом оценки активности. Следовательно, можно сказать, что в данной системе авторы адекватно оценивали только специфичность вариантов Cas9. Действительно, evoCas9 – самый специфичный Cas9-мутант, хотя полученные нами и другими авторами [14] данные свидетельствуют о том, что у него самая низкая активность как в дрожжах, так и в клетках млекопитающих.

Таким образом, полученная нами тест-система редактирования генома с геном *ADE2* в качестве репортера может быть использована для разработки активных мутантных форм нуклеазы Cas9 с учетом влияния структуры хроматина, а также для оценки специфичности вариантов Cas9 в сочетании с несовершенными спейсерами.

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН за предоставленные вычислительные мощности и методики для анализа данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-14-00377.

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/ru1/ckp/ssu_genome_se.php).

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. **337**, 816–821.
2. Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. **157**, 1262–1278.
3. Jiang F., Doudna J.A. (2017) CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529.
4. Xue C., Greene E.C. (2021) DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Trends Genet.* **37**, 639–656.
5. Jacinto F. V., Link W., Ferreira B.I. (2020) CRISPR/Cas9-mediated genome editing: from basic research to translational medicine. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 3766–3778.
6. Mali P., Aach J., Stranges P.B., Esvelt K.M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G.M. (2013) Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* **31**, 833–838.
7. Zhang X.-H., Tee L.Y., Wang X.-G., Huang Q.-S., Yang S.-H. (2015) Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. **4**, e264.
8. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. **351**, 84–88.
9. Bao Z., Xiao H., Liang J., Zhang L., Xiong X., Sun N., Si T., Zhao H. (2015) Homology-integrated CRISPR–Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.* **4**, 585–594.
10. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. (2016) High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. **529**, 490–495.
11. Chen J.S., Dagdas Y.S., Kleinstiver B.P., Welch M.M., Sousa A.A., Harrington L.B., Sternberg S.H., Joung J.K., Yildiz A., Doudna J.A. (2017) Enhanced proofreading governs CRISPR–Cas9 targeting accuracy. *Nature*. **550**, 407–410.
12. Vakulskas C.A., Dever D.P., Rettig G.R., Turk R., Jacobi A.M., Collingwood M.A., Bode N.M., McNeill M.S., Yan S., Camarena J., Lee C.M., Park S.H., Wiebking V., Bak R.O., Gomez-Ospina N., Pavel-Dinu M., Sun W., Bao G., Porteus M.H., Behlke M.A. (2018) A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat. Med.* **24**, 1216–1224.
13. Casini A., Olivieri M., Petris G., Montagna C., Reginato G., Maule G., Lorenzin F., Prandi D., Romanel A., Demichelis F., Inga A., Cereseto A. (2018) A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast. *Nat. Biotechnol.* **36**, 265–271.

14. Schmid-Burgk J.L., Gao L., Li D., Gardner Z., Streckler J., Lash B., Zhang F. (2020) Highly parallel profiling of Cas9 variant specificity. *Mol. Cell.* **78**, 794–800. e8.
15. Lee J.K., Jeong E., Lee J., Jung M., Shin E., Kim Y., Lee K., Jung I., Kim D., Kim S., Kim J.-S. (2018) Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nat. Commun.* **9**, 3048.
16. Zischewski J., Fischer R., Bortesi L. (2017) Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnol. Adv.* **35**, 95–104.
17. Ломов Н.А., Вьюшков В.С., Петренко А.П., Сыркина М.С., Рубцов М.А. (2019) Методы оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas при геномном редактировании. *Молекуляр. биология.* **53**, 982–997.
<https://doi.org/10.1134/S0026893319060116>
18. Anders C., Jinek M. (2014) *In vitro* enzymology of Cas9. *Methods Enzymol.* **546**, 1–20.
19. Fu B.X.H., St. Onge R.P., Fire A.Z., Smith J.D. (2016) Distinct patterns of Cas9 mismatch tolerance *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5365–5377.
20. Yarrington R.M., Verma S., Schwartz S., Trautman J.K., Carroll D. (2018) Nucleosomes inhibit target cleavage by CRISPR-Cas9 *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **115**, 9351–9358.
21. Uusi-Mäkelä M.I.E., Barker H.R., Bäuerlein C.A., Häkkinen T., Nykter M., Rämetsä M. (2018) Chromatin accessibility is associated with CRISPR-Cas9 efficiency in the zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One.* **13**, e0196238.
22. Raymond C.K., Pownder T.A., Sexson S.L. (1999) General method for plasmid construction using homologous recombination. *Biotechniques.* **26**, 134–141.
23. Spasskaya D.S., Kotlov M.I., Lekanov D.S., Tutyaeva V.V., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Karpov V.L., Karpov D.S. (2021) CRISPR/Cas9-mediated genome engineering reveals the contribution of the 26S proteasome to the extremophilic nature of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *ACS Synth. Biol.* **10**, 297–308.
24. Liljeruhm J., Funk S.K., Tietscher S., Edlund A.D., Jamal S., Wistrand-Yuen P., Dyrhage K., Gynnå A., Ivermark K., Lövgren J., Törnblom V., Virtanen A., Lundin E.R., Wistrand-Yuen E., Forster A.C. (2018) Engineering a palette of eukaryotic chromoproteins for bacterial synthetic biology. *J. Biol. Eng.* **12**, 8.
25. Gietz R.D., Schiestl R.H. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* **2**, 31–34.
26. DiCarlo J.E., Norville J.E., Mali P., Rios X., Aach J., Church G.M. (2013) Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4336–4343.
27. Farzadfard F., Perli S.D., Lu T.K. (2013) Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. *ACS Synth. Biol.* **2**, 604–613.
28. Concordet J.-P., Haeussler M. (2018) CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* **46**, W242–W245.
29. Zhang G.-C., Kong I.I., Kim H., Liu J.-J., Cate J.H.D., Jin Y.-S. (2014) Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 7694–7701.
30. Jakočiūnas T., Rajkumar A.S., Zhang J., Arsovska D., Rodriguez A., Jendresen C.B., Skjødtt M.L., Nielsen A.T., Borodina I., Jensen M.K., Keasling J.D. (2015) CasEMBLR: Cas9-facilitated multiloci genomic integration of *in vivo* assembled DNA parts in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.* **4**, 1226–1234.
31. Pronk J.T. (2002) Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2095–2100.
32. Dudášová Z., Dudáš A., Chovanec M. (2004) Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 581–601.
33. Letavayová L., Marková E., Hermanská K., Vlčková V., Vlasáková D., Chovanec M., Brozmanová J. (2006) Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst.)* **5**, 602–610.
34. Dorfman B.Z. (1969) The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. *Genetics.* **61**, 377–389.
35. Stovicek V., Borodina I., Forster J. (2015) CRISPR-Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab. Eng. Commun.* **2**, 13–22.
36. Degreif D., Kremenovic M., Geiger T., Bertl A. (2018) Preloading budding yeast with all-in-one CRISPR/Cas9 vectors for easy and high-efficient genome editing. *J. Biol. Methods.* **5**, e98.
37. Jiang C., Pugh B.F. (2009) A compiled and systematic reference map of nucleosome positions across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genome Biol.* **10**, R109.
38. Eki R., She J., Parlak M., Benamar M., Du K.-P., Kumar P., Abbas T. (2020) A robust CRISPR-Cas9-based fluorescent reporter assay for the detection and quantification of DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* **48**, e126–e126.
39. Glaser A., McColl B., Vadolas J. (2016) GFP to BFP conversion: a versatile assay for the quantification of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* **5**, e334.
40. Idoko-Akoh A., Taylor L., Sang H.M., McGrew M.J. (2018) High fidelity CRISPR/Cas9 increases precise monoallelic and biallelic editing events in primordial germ cells. *Sci. Rep.* **8**, 15126.
41. Miyaoka Y., Berman J.R., Cooper S.B., Mayerl S.J., Chan A.H., Zhang B., Karlin-Neumann G.A., Conklin B.R. (2016) Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. *Sci. Rep.* **6**, 23549.
42. Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V. V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P.W., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.-R.J., Aryee M.J., Joung J.K. (2015) Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature.* **523**, 481–485.

A Test System for Assessment of Activity of Mutant Cas9 Variants in *Saccharomyces cerevisiae*

D. S. Spasskaya^{1, *}, A. I. Davletshin², V. V. Tutyaeva¹,
K. A. Kulagin², D. G. Garbuz¹, and D. S. Karpov¹

¹Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: drspssk@gmail.com

The key component of the *Streptococcus pyogenes* CRISPR/Cas revolutionary genome editing technology is the multidomain Cas9 protein. However, the specificity of Cas9 of wild type is not sufficiently high for editing large genomes of higher eukaryotes that limits the realization of the potential of genomic editing both in fundamental investigations and in the therapy of genetic diseases. The main way to obtain more specific variants of Cas9 is through mutagenesis followed by characterization of mutant proteins in *in vitro* or *in vivo* test systems. The *in vitro* and some *in vivo* test systems described in the literature are often labor-intensive and have scaling limitations, which make it challenging, in particular, to screen SpCas9 mutant variant libraries. In order to develop a simple method for high-throughput screening of Cas9 mutants *in vivo*, we characterized three test systems using CRISPR/Cas9-mediated inactivation of reporter genes, *tsPurple*, *ADE2*, and *URA3*, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model subject. We measured the activities of high-precision forms of Cas9, evoCas9 and HiFiCas9, and compared them with the wild-type one. The *ADE2* gene inactivation was found to be the most valid method for the evaluation of Cas9 activity. In developed test-system, the sensitivity to the chromatin structure was demonstrated for high-fidelity variants of Cas9, HiFiCas9. The proposed test-system can be applied in the development of new generation genome editors.

Keywords: Cas9, *URA3*, *ADE2*, genome editing, *Saccharomyces cerevisiae*

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

УДК 581.1.577.21

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

© 2022 г. Б. Р. Кулуев^{a, b, *}, Е. В. Михайлова^{a, b}, А. Р. Кулуев^a,
А. А. Галимова^{a, b}, Е. А. Заикина^a, Е. К. Хлесткина^b^aИнститут биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия^bВсероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,
Санкт-Петербург, 190000 Россия

*e-mail: kuluev@bk.ru

Поступила в редакцию 05.04.2022 г.

После доработки 22.05.2022 г.

Принята к публикации 01.06.2022 г.

К трибе Triticeae (Пшеницевые) относятся такие важнейшие сельскохозяйственные культуры, как пшеница мягкая, пшеница твердая, ячмень, рожь и тритикале. Исследования в области обратной генетики и геновая инженерия Пшеницевых получили новый импульс, когда началось активное применение системы геномного редактирования CRISPR/Cas. В настоящем обзоре собраны и проанализированы данные о недавних успехах геномного редактирования культурных растений трибы Triticeae и используемом для этого инструментарии. Наиболее часто в геномном редактировании Пшеницевых используют оптимизированный по составу кодонов ген *Cas9* под контролем промотора гена убиквитина кукурузы и направляющие РНК под контролем промоторов U6 и U3 РНК-полимеразы III в составе одного или нескольких бинарных векторов. В качестве селективных генов используются гены устойчивости к фосфинотрицину и гигромицину. Редактированные растения получают с помощью методов агробактериальной трансформации и биобаллистики, в качестве эксплантов используют незрелые зародыши. Разрабатываются подходы, направленные на преодоление низкой регенеративной способности представителей трибы Пшеницевые: трансформация апикальных меристем побега *in planta*, микроспор и пыльцевых зерен, а также использование гаплоиндукторов. Большая часть опубликованных на сегодняшний день работ посвящена геномному редактированию пшеницы мягкой и ячменя, хотя описано проведение нокаута целевых генов пшеницы твердой и тритикале методом CRISPR/Cas. Дальнейший прогресс в развитии геномного редактирования культурных растений трибы Пшеницевые должен быть направлен на расширение спектра видов и сортов, а также преодоление проблем низкой способности к регенерации, что позволит проводить работы по генетической модификации элитных сортов, которые будут востребованы в сельскохозяйственном производстве.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Triticum durum*, × *Triticosecale*, пшеница мягкая, ячмень, промоторы, селективный ген, агробактериальная трансформация, незрелые зародыши, микроспоры, гаплоиндукторы

DOI: 10.31857/S0026898422060155

ВВЕДЕНИЕ

К трибе Пшеницевые (Triticeae Dumort.) относятся такие важнейшие для всего человечества злаковые культуры, как пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.), ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.), рожь (*Secale cereale* L.), пшеница твердая

(*Triticum durum* Desf.), тритикале (× *Triticosecale* Wittm. ex A. Camus) и некоторые другие виды. Пшеницу мягкую — основную сельскохозяйственную культуру, потребляют более 30% населения Земли [1]. Эта культура обеспечивает примерно 20% калорий суточного рациона человека [2]. Четвертой по значимости зерновой культурой после пшеницы мягкой, риса и кукурузы является ячмень [3]. К ключевым зерновым культурам в России и ряде других стран относятся также рожь, тритикале и пшеница твердая.

Многообразие экологических условий возделывания зерновых культур, в частности пшени-

Сокращения: DSB (Double-Strand Breaks) — двухцепочечные разрывы; HDR (Homology Directed Repair) — гомологичная репарация; NHEJ (Non-Homologous End Joining) — негомологичное соединение концов; гРНК (guide RNA) — направляющая, или гидовая РНК; PAM (Protospacer Adjacent Motif) — мотив, прилегающий к протоспейсеру.

цы, непредсказуемость погодных явлений, давление со стороны биотических стрессоров, антропогенных факторов и пестицидной нагрузки требуют большого разнообразия генофонда возделываемых сортов, в связи с чем актуальным становится ускорение темпов селекции. Так, в Национальном центре зерна имени П.П. Лукьяненко (Краснодар) за последние несколько лет (2014–2020) интенсивность создания сортов выросла почти в 10 раз в сравнении с периодом с 1913 по 1973 гг. [4]. Срок создания каждого сорта за это время также сократился, в том числе за счет отбора, контролируемого с помощью маркеров. Однако несмотря на развитие и разнообразие методов, применяемых в селекции, создание новых сортов происходит главным образом на основе комбинирования существующих в природе вариантов генов того же самого или близких видов растений [5]. Определенного прогресса в расширении аллельного разнообразия генов зерновых культур удалось добиться в результате внедрения методов химического и радиационного мутагенеза [6, 7]. Эффективным методом увеличения генетического разнообразия целого ряда культур стало применение генетической трансформации. Однако пшеница и родственные ей виды являются культурами, довольно сложными для генетической трансформации [8]. Основную проблему представляет то, что агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*, широко используемые для генетической трансформации двудольных растений, в природе не инфицируют однодольные. Поэтому для трансформации однодольных в первое время использовали исключительно метод биобаллистики, менее эффективный, чем агробактериальная трансформация. Однако уже в 1997 году впервые разработали высокоэффективную методику агробактериальной трансформации мягкой пшеницы [9], после чего эти методы совершенствовались, а для ячменя стали уже классическими. Вторую проблему при генетической трансформации представителей трибы Пшеницевые представляет их очень низкая способность к регенерации в культуре *in vitro*. Эта проблема решена лишь отчасти, в основном путем постоянного поиска наиболее эффективно регенерирующих сортов и выбором подходящих эксплантов и состава питательной среды. В качестве эксплантов, пригодных для трансформации представителей трибы Пшеницевые, чаще всего выбирают незрелые зародыши [8], но даже при работе с ними возникают проблемы с уровнем регенерации. Среди сортов ячменя эффективным оказался Golden Promise, ставший хорошим модельным сортом для фундаментальных исследований. Однако использование модельных сортов (в случае ячменя основными объектами генно-инженерных исследований до сих пор остаются Golden Promise и Igr1, несмотря на многократные попытки расширить круг исполь-

зуемых генотипов [10–12]), не снимает проблему практического применения методов генной инженерии, где в качестве объектов трансформации должны выступать разнообразные коммерческие сорта. Определенный выход из ситуации появился с открытием генов *TFA* (*transformation amenability*) ячменя. Предложено на ранних этапах селекции использовать Golden Promise в качестве донора генов *TFA1*, *TFA2* и *TFA3*, проводить маркер-контролируемый отбор потомства от скрещиваний с коммерческими сортами, чтобы перспективный селекционный материал обладал свойством *transformation amenability*, как и модельные сорта [13]. Таким образом, не прекращается поиск способов повышения эффективности трансформации и регенерации представителей трибы Пшеницевые.

На сегодняшний день создано, в том числе с использованием нуклеаз ZFN [14] и TALEN [2], немалое число трансгенных и отредактированных растений трибы Triticeae с хозяйственно-ценными признаками. Однако настоящей революцией стала разработка метода геномного редактирования CRISPR/Cas, где место действия редактирующей нуклеазы определяет короткая направляющая, или гидовая РНК (нРНК). Система CRISPR/Cas имеет ряд преимуществ перед методами ZFN/TALEN, включая больший ассортимент целевых сайтов, простоту создания генно-инженерных конструкций, возможность мультиплексного нокаута [15].

Системы CRISPR/Cas, состоящие из белка Cas и нРНК, вносят в мишени двухцепочечные разрывы (DSB), что приводит к индукции эндогенных механизмов репарации, которые могут зависеть от пути репарации и наличия или отсутствия донорной ДНК. Присутствие донорной ДНК, сходной с областью-мишенью, может способствовать направляемой гомологией репарации (HDR), тогда как отсутствие гомологичной донорной ДНК способствует репарации путем негомологичного соединения концов (NHEJ), которое подвержено ошибкам и приводит к случайным заменам нуклеотидов или же к коротким вставкам и делециям (инделям). нРНК можно подобрать практически к любому участку генома. При этом нужно учитывать, что для связывания нуклеазы критично присутствие мотива PAM с одной стороны выбранного участка редактирования (протоспейсера). Для SpCas9 последовательность PAM – это NGG с 5'-конца, для FnCas12a – TTN с 3'-конца, другие нуклеазы Cas также имеют свои особенности [16]. Cas9 обычно расщепляет ДНК на три нуклеотида выше PAM, тогда как Cas12b – в промежутке от 12 до 24 н. после PAM [5, 17].

Ввиду того, что с каждым годом появляется все больше экспериментальных работ, посвященных

геномному редактированию злаковых культур, возникает необходимость в обобщении и осмыслении полученных данных, а также в сравнении эффективности используемого инструментария. Большая часть экспериментальных работ, проведенных на культурных видах семейства Злаковые, выполнена на растениях риса и кукурузы – сельскохозяйственных культурах, ключевых для стран Азии и Центральной Америки соответственно. Но для многих стран, включая Россию, наибольшее значение имеют злаковые культуры трибы Пшеницевые. Геномное редактирование растений этой группы, например, редактирование ячменя и мягкой пшеницы с помощью системы CRISPR/Cas рассмотрено в нескольких обзорах [18–20]. В нашем обзоре проанализированы данные об успехах геномного редактирования культурных растений трибы Triticeae и используемом для этого инструментарии.

ПОДБОР НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

К важной составляющей технологии CRISPR/Cas относится выбор мишеней – конкретных нуклеотидных последовательностей (протоспейсеров) – в намеченных для редактирования генах, сопряженный с дизайном нРНК с использованием специализированных компьютерных программ. Правила подбора нРНК и используемые для этого компьютерные программы опубликованы ранее [21, 22]. Для подбора нРНК с целью редактирования геномов Пшеницевых можно использовать большинство существующих программ. Однако имеются и специализированные программы, например, программа WheatCrispr ориентирована на дизайн нРНК исключительно для редактирования генома пшеницы мягкой. В этой программе для поиска протоспейсеров необходимо выбрать конкретный редактируемый ген из созданной усилиями International Wheat Genome Sequencing Consortium базы данных IWGSC RefSeq assembly (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies>) или самостоятельно ввести последовательность. Результаты ранжируются по общей эффективности редактирования с учетом возможных нецелевых сайтов. Учитывая, что пшеница мягкая имеет аллогексаплоидный геном, можно искать протоспейсеры в гомологичных последовательностях всех трех субгеномов: В, А и D, выбрав соответствующую опцию. Еще одна опция этой программы позволяет выбрать участок редактирования – кодирующие области или промоторы.

Многие компьютерные программы позволяют проводить поиск нецелевых участков, если геном организма депонирован в базу данных, например, геномы пшеницы мягкой и ячменя доступны в таких программах, как E-CRISP ([\[org/E-CRISP/\]\(http://www.e-crisp.org/E-CRISP/\)\) \[23\], CRISPRdirect \(<http://crispr-dbcls.jp>\) \[24\], DESKGEN \(<https://www.deskgen.com/landing/cloud>\) \[25\]. Однако на сегодняшний день наиболее предпочтительно использовать компьютерные программы по подбору нРНК, имеющие доступ к базе данных Ensembl. К примеру, программы Breaking Cas \(<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>\), CLD \(<https://github.com/boutroslob/cld>\), Synthego CRISPR Design Tool \(<https://design.synthego.com/#/>\) работают совместно с базой Ensembl. Большинство новых программ по подбору нРНК имеют доступ к Ensembl.](http://www.e-crisp-</p></div><div data-bbox=)

В последнее время серьезное внимание при подборе нРНК стали уделять локализации редактируемых мест генома в эу- или гетерохроматиновых участках, так как от этого зависит эффективность процесса редактирования [22]. Особенно это актуально для полиплоидных видов трибы Пшеницевые. Так, web-ресурс CROP-IT (CRISPR/Cas9 Off-target Prediction and Identification Tool) [26] (<http://www.adlilab.org/CROP-IT/cas9tool.html>) рассчитан на дизайн нРНК и выявление потенциальных нецелевых сайтов редактирования с учетом состояния хроматина в этих местах.

Необходимо также учитывать наличие функционально заменяемых гомеологичных генов у представителей трибы Пшеницевые, имеющих полиплоидный геном, поэтому для полного нокаута следует подбирать нРНК, нацеленные на консервативные участки целевых генов [1]. С целью повышения эффективности геномного редактирования для нокаута одного гена могут быть отобраны до пяти разных нРНК [27].

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ВИДОВ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ

Для трансформации клеток с целью получения трансгенных растений используют, как правило, векторы, содержащие область Т-ДНК, которая переносится в геном растений при агробактериальной трансформации. В пределах Т-области обычно располагаются минимум три последовательности с необходимыми регуляторными элементами, обеспечивающими их экспрессию: нРНК, ген *Cas9* и ген селективного маркера, позволяющего произвести отбор трансформантов [5]. При бомбардировке золотыми (вольфрамовыми) частицами можно использовать молекулярные векторы без Т-границ.

Ассортимент инструментов, используемых в работах по геномному редактированию Пшеницевых, остается относительно небольшим. В геномном редактировании растений применяют ген *Cas*, оптимизированный по составу кодонов для однодольных или двудольных растений. Эффективность редактирования с помощью опти-

мизированного таким образом гена *Cas* выше, чем при использовании гена *Cas*, оптимизированного для человека [28–30].

В подавляющем большинстве случаев ген *Cas9* находится под контролем промотора *ZmUbi* (ген убиквитина кукурузы) [2, 27, 31–33]. Крайне редко с этой целью используют другие промоторы, например промоторы *TaUbi* (ген убиквитина пшеницы) [34], *OsUbi* (ген убиквитина риса) [35] или *35S CaMV* (вирус мозаики цветной капусты) [30]. Промотор *35S CaMV* не получил распространения в геномном редактировании пшеницы, хотя довольно часто применяется в классической генной инженерии [36].

Большее разнообразие характерно для применяемых в геномном редактировании Пшеницевых промоторов, контролирующих экспрессию нРНК. Так, сравнивают промоторы *U6* и *U3* РНК-полимеразы (*Pol*) III, в том числе из разных видов растений [37, 38]. Среди промоторов *TaU3* и *TaU6* пшеницы, а также *OsU3* и *OsU6* риса наиболее эффективным оказался *TaU3* [39]. Но наибольшую эффективность редактирования Пшеницевых, по всей видимости, обеспечивают промоторы *Pol* II. При использовании промотора вируса желтого скручивания листьев цеструма (*SmYLCV*) для полицистронной экспрессии нРНК, расщепляемых рибозимами, эффективность геномного редактирования пшеницы возросла более чем в 4 раза [40]. Промотор гена актина риса успешно применили для полицистронной экспрессии нРНК, расщепляемых РНКазами (система *tRNA-gRNA*), благодаря чему удалось создать единую мультиплексную конструкцию для 15 мишеней, причем эффективность редактирования достигала 75% [41].

В случае геномного редактирования *H. vulgare* нРНК экспрессировали с использованием промоторов *TaU6* пшеницы [42, 43], *OsU6* риса [27], а также *HvU3* ячменя [44, 45]. При этом ген *Cas9* во всех этих исследованиях находился под контролем промотора *ZmUbi* кукурузы.

В качестве селективного гена используют либо *bar* (ген устойчивости к фосфинотрицину/глюкофосинату) [2, 46], либо *hptII* (ген устойчивости к гигромицину) [27, 47, 48]. Другие селективные гены при геномном редактировании Пшеницевых не применяли. В ряде случаев применяют селективные гены, которые дополняют репортерными генами, кодирующими флуоресцентные белки, такие как GFP [49] и DsRed [47].

Таким образом, можно констатировать, что в геномном редактировании Пшеницевых используется весьма скромный набор промоторов, особенно в случае гена *Cas*. Более того, в классической генной инженерии известно не так много растительных конститутивных промоторов, которые могли бы эффективно работать у Пшени-

цевых [50]. К наиболее хорошо изученным относятся промоторы генов актина (*Act1*) и алкогольдегидрогеназы (*Adh1*) [51]. Для трансформации пшеницы предлагались также промоторы палочковидного баднавируса сахарного тростника *Sc-BV* [52], вируса карликовости пшеницы (*WDV*) и LIR-промотор *WDV* [31], но они не получили широкого распространения.

Сравнительно небольшой набор инструментов, применяемых в геномном редактировании пшеницы, можно объяснить использованием традиционных “пустых” векторов и векторных систем с ограниченным набором промоторов [16, 53–70]. Поэтому актуальными остаются исследования, направленные на увеличение ассортимента доступных средств геномного редактирования Пшеницевых.

СПОСОБЫ ДОСТАВКИ КОМПОНЕНТОВ CRISPR/Cas И МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Процесс получения трансгенных однодольных растений достаточно длительный и трудоемкий, поэтому при планировании эксперимента по редактированию генома имеет смысл сначала протестировать редактирующую систему на популяции клеток (например, на протопластах или каллусах) при помощи транзientной экспрессии [5]. Это позволяет быстро оценить эффективность разных вариантов генетических конструкций и выбрать наиболее подходящие для продолжения эксперимента и получения трансгенных растений. Именно поэтому во многих исследованиях эффективность генно-инженерных конструкций проверяют на протопластах [38]. Более того, результаты многих работ по геномному редактированию представителей трибы Пшеницевые публикуются на стадии протестирования эффективности конструкций в протопластах [32, 49, 58].

При получении стабильных трансформантов или “нокаутных” растений без трансгенов в качестве эксплантов для генетической трансформации Пшеницевых чаще всего используют незрелые зародыши (табл. 1). Компоненты CRISPR/Cas в геном мягкой пшеницы часто доставляют с помощью бомбардировки золотыми частицами [1, 56]. Однако достаточно часто применяют и агробактериальную трансформацию [38, 48, 63]. Более того, подавляющее большинство экспериментов по геномному редактированию ячменя связано с использованием агробактерий [35, 45, 69]. Не прекращаются работы по повышению эффективности методов генетической трансформации и регенеративной способности эксплантов Пшеницевых. Например, разработана надежная и воспроизводимая система трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*, которая позволила добиться 33%-ной эффективности

трансформации пшеницы мягкой. В качестве исходного материала использовали незрелые зародыши, которые центрифугировали перед агробактериальной инокуляцией [71].

Широкое распространение получили также способы доставки компонентов CRISPR/Cas в клетки растений с использованием вирусов растений, позволяющих существенно увеличить наработку нРНК и Cas-нуклеазы, а при необходимости и донорной ДНК, и повысить эффективность редактирования [72, 73]. Gil-Humanes и соавт. [31] разработали на основе репликационной системы генетического редактирования зерновых культур с использованием WDV. Использованный в этой работе вектор pWDV2, содержащий как ген *Cas9*, так и нРНК, оказался в 12 раз эффективнее других векторов. Обычно компоненты CRISPR/Cas при использовании вирусных векторов в геном не встраиваются.

Чтобы избежать интеграции чужеродной ДНК в процессе редактирования генома, разработан также подход, в котором используется готовый РНП-комплекс из соответствующей Cas-нуклеазы и нРНК, сорбированных на золотых частицах, доставку которых осуществляли с помощью биобаллистики [72]. На примере пшеницы мягкой показано, что использование РНП снижает вероятность нецелевых мутаций, которые могут возникать при интеграции компонентов CRISPR/Cas в геном. Поскольку при редактировании генома, опосредованном РНП, чужеродная ДНК не используется, полученные мутанты не содержат трансгенов [74]. Разработан также подробный протокол геномного редактирования пшеницы мягкой с помощью биобаллистической рибонуклеопротеидной трансформации [75].

Одной из самых трудноразрешимых проблем при генетической трансформации Пшеницевых остается низкий уровень регенерации и невозможность геномного редактирования многих элитных сортов. Одним из подходов, направленных на решение этой проблемы, можно назвать бомбардировку золотыми частицами апикальных меристем побега *in planta* (метод iPB). Сообщалось о применении метода iPB к коммерчески значимым японским элитным сортам пшеницы; при этом проводили бомбардировку набухших зрелых семян с обнаженной апикальной меристемой побега [67]. В дальнейшем анализировали мутации в гене-мишени в ткани флагового листа. В результате мутантные аллели выявили в тканях 2.51% растений, подвергшихся бомбардировке, однако все мутантные растения были химерными, и в поколении T₂ обнаружен лишь один тройной рецессивный гомозиготный мутант.

На решение проблем, связанных с низким уровнем регенеративной способности Пшеницевых, направлены также подходы к использова-

нию гаплоиндукторов в геномном редактировании. Разработаны методы индукции гаплоидов *Arabidopsis thaliana in planta* путем элиминации генома одного родителя путем модификации гена *CENTROMERIC HISTONE 3 (CENH3)* [76] кукурузы и риса путем нокаута гена спермоспецифичной фосфолипазы [77, 78], а также пшеницы — посредством межродового скрещивания с кукурузой [79]. Ранее сообщалось о гаплоиндукции в сочетании с сайт-направленным мутагенезом у *A. thaliana*, кукурузы и пшеницы [80]. Накопленный опыт позволил развить методы геномного редактирования Пшеницевых с использованием гаплоиндукторов. К примеру, в геном кукурузы внедрили последовательности *Cas9* и нРНК, подобранные для нокаута всех гомеологов генов *Ta-BR1* и *TaSD1* у мягкой и твердой пшеницы [81]. Эмбрионы, полученные в результате межродовых скрещиваний трансгенной кукурузы и мягкой пшеницы, регенерировали в условиях *in vitro* с образованием “нокаутных” растений пшеницы.

В целом, одним из популярных направлений геномного редактирования Пшеницевых является получение мутантных растений, не содержащих трансгенов. В результате обеспечивается более низкий уровень редактирования нецелевых участков, а растения, не содержащие трансгенов, могут быстрее получить разрешение на коммерческое возделывание [72, 73]. Одними из первых этот подход реализовали Zhang и соавт. [46], в работе которых компоненты CRISPR/Cas транзитивно экспрессировались в ткани каллуса, а побеги-регенеранты уже не содержали трансгенов. Трансгены обычно не интегрируются в геном растения и при использовании вирусных векторов [31]. Однако, несмотря на очевидные преимущества получения нетрансгенных растений, при этом возможны сложности с селективным отбором.

Отдельно необходимо отметить, что эффективность (полнота) геномного редактирования и его специфичность (воздействие преимущественно или исключительно на целевые сайты) фактически противостоят друг другу. Так, эффективность редактирования намеченных участков генома будет тем выше, чем дольше в клетке работают Cas-нуклеаза и нРНК, но при этом возрастает вероятность нецелевого редактирования [22].

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ КУЛЬТУР ПЫЛЬНИКОВ И МИКРОСПОР ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ

Микроспоры, или незрелые пыльцевые зерна, представляют собой гаплоидные клетки, обладающие способностью регенерировать *in vitro* в целые растения. Тотипотентность микроспор обычно используется для создания дигаплоидных растений в рамках ускоренной селекции сельскохозяйствен-

Таблица 1. Гены, фенотипические эффекты их нокаута, методы доставки компонентов системы CRISPR/Cas

| Ген | GenBank/Ensembl | Вид растения | Метод доставки | Фенотип нокаута | Ссылка |
|----------------------------------|------------------------------|---|--|--|----------|
| <i>TaMLO</i> | KM017011 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Повышение устойчивости к мучнистой росе | [2] |
| <i>TdGASR7</i> | KJ000053 | <i>T. durum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Увеличение массы зерна | [46] |
| <i>ENGase</i> | MLOC_10039.2 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация и бомбардировка незрелых зародышей | Нет отличий от дикого типа | [27] |
| <i>HvPAPhy_a</i> | FJ974003 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Уменьшение фитазной активности зерна, замедление прорастания зерна | [43] |
| <i>TaGW2</i> | KY264770, KY264771, KY264772 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами с РНП | Повышение продуктивности | [74] |
| <i>TaEDR1</i> | AAU89661.2 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Повышение устойчивости к мучнистой росе | [57] |
| <i>TaGli-2</i> | AJ133612, JN831396, HM120222 | <i>T. aestivum</i> , <i>T. durum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Снижение иммунореактивности | [56] |
| <i>TaMs45</i> | AY660990 | <i>T. aestivum</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Мужская стерильность | [96] |
| <i>TaLpx-1</i> | KC679300 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Повышение устойчивости к фузариозу | [33] |
| <i>TaLox2</i> | GU167921 | <i>T. aestivum</i> | Электропорация микроспор | Увеличение содержания полиненасыщенных жирных кислот | [47] |
| <i>TaDREB2</i> | DQ353852 | <i>T. aestivum</i> | ПЭГ-трансформация протопластов | Увеличение чувствительности к засухе | [58] |
| <i>TaERF3</i> | EF570122 | <i>T. aestivum</i> | ПЭГ-трансформация протопластов | Увеличение чувствительности к засухе | [58] |
| <i>HvCKX1</i> и <i>HvCKX3</i> | — | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | — | [94] |
| <i>HvNud</i> | KP245804 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Голозерность | [92, 94] |
| <i>TaGW2</i> | KY264770, KY264771, KY264772 | <i>T. aestivum</i> | ПЭГ-трансформация протопластов | Повышение продуктивности зерна | [32] |
| <i>TaPinb</i> | AB262660 | <i>T. aestivum</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Повышение твердости эндосперма | [38] |
| <i>TaWx</i> | AB737985, LC379886, KF007196 | <i>T. aestivum</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Уменьшение содержания амилозы в муке | [38] |
| <i>TaDA1</i> | KM005099 | <i>T. aestivum</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Увеличение массы зерна | [38] |
| <i>TaQsd1</i> | HW250906, HW250899, HW250898 | <i>T. aestivum</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Уменьшение рисков прорастания на корню | [48] |

Таблица 1. Продолжение

| Ген | GenBank/Ensembl | Вид растения | Метод доставки | Фенотип нокаута | Ссылка |
|--|---|-------------------------------|---|---|--------|
| <i>TaGW7</i> | TraesCS2A01G176000, TraesCS2B01G202300, TraesCS2D01G183400 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Увеличение ширины и массы зерна | [60] |
| <i>HvCKX1</i> и <i>HvCKX3</i> | HOR- VU3Hr1G019850, HORVU1Hr1G042360 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Изменения по длине корней и количеству корневых волосков | [95] |
| <i>WDVsgRNA</i> | MK193742 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Повышение устойчивости к вирусу карликовости пшеницы (WDV) | [85] |
| <i>D-hordein</i> | JQ867076.1 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Уменьшение размера зерна, уменьшение содержания проламинов, увеличение содержания глютеинов | [91] |
| <i>HvITPK1</i> | HORVU7Hr1G033170 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Снижение содержания фитиновой кислоты в зерне | [89] |
| <i>TaNFXL1</i> | HQ595068, HQ595069, HQ595070 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Устойчивость к фузариозу | [34] |
| <i>TaNPI</i> | TraesCS1A02G187500, TraesCS1B02G195300, TraesCS1D02G189200 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Мужская стерильность | [39] |
| <i>WTAI-CM3</i> , <i>WTAI-CM16</i> | Нет данных | <i>T. durum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Снижение содержания аллергенных белков | [64] |
| <i>BR11</i> | DQ655711 | <i>T. durum</i> | С использованием трансгенной кукурузы в качестве гаплоиндуктора | Укорочение стебля | [81] |
| <i>SD1</i> | Нет данных | <i>T. durum</i> | С использованием трансгенной кукурузы в качестве гаплоиндуктора | Укорочение стебля | [81] |
| <i>HvHPT</i> | HORVU7Hr1G110990 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Уменьшение размера и массы зерна, снижение содержания токоферолов и токотриенолов | [35] |
| <i>HvHGGT</i> | HORVU7Hr1G114330 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Уменьшение размера и массы зерна, снижение содержания токотриенолов | [35] |
| <i>HvPDS</i> | HORVU3Hr1G090980 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация каллуса из микроспор | Альбинизм | [82] |
| β -1,3-глюканаза | X67099, AK248899 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Устойчивость к гле <i>Rhopalosiphum padi</i> не увеличилась | [86] |
| <i>HvCslF3</i> , <i>HvCslF6</i> , <i>HvCslF9</i> , <i>HvCslH1</i> | HORVU(2Hr1G04235 0.3, 0Hr1G027460.1, 4Hr1G067680.2, 2Hr1G074940.3) | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Уменьшение содержания (1,3;1,4)- β -глюкана в зерне | [90] |
| <i>TsABA8'OH1</i> | AB714574.1, AB714575.1 | \times <i>Triticosecale</i> | ПЭГ-трансформация протопластов | Уменьшение рисков прораствания на корню | [49] |

Таблица 1. Окончание

| Ген | GenBank/Ensembl | Вид растения | Метод доставки | Фенотип нокаута | Ссылка |
|---|--|--------------------|---|--|--------|
| <i>TaMs2</i> | KX951468 | <i>T. aestivum</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Восстановление мужской фертильности | [63] |
| <i>TaSBEIIa</i> | HE591389, FM865435, AF338431 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Увеличение содержания амилозы в муке | [1] |
| <i>TaARE1</i> | KAF7095826.1, KAF7101772.1 KAF7108895.1 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Повышение эффективности усвоения азота, замедление старения | [65] |
| <i>TaASN2</i> | TraesCAD_scaffold_023055_01G000100, TraesCAD_scaffold_036944_01G000100, TraesCAD_scaffold_017129_01G000200 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Уменьшение содержания акриламида в выпечке | [66] |
| <i>TaHAG1</i> | TraesCS1D02G134200 | <i>T. aestivum</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Снижение солеустойчивости | [97] |
| <i>TaNPT1</i> , <i>TaSPDT</i> , <i>TaIPA1</i> | Нет данных | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | н.д. | [41] |
| <i>TaPDS</i> | FJ517553 | <i>T. aestivum</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Альбинизм | [1] |
| <i>TaBAK1-2</i> | EU679373 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Регуляция иммунитета и развития растений | [67] |
| <i>Ta-eIF4E</i> | Z12616.2 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Устойчивость к вирусам WSSMV и WYMV | [67] |
| <i>Ta-eIF(iso)4E</i> | Z12616 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Устойчивость к вирусам WSSMV и WYMV | [67] |
| <i>TaQsd1</i> | HW250906, HW250899, HW250898 | <i>T. aestivum</i> | <i>In planta</i> бомбардировка золотыми частицами апикальной меристемы побега | Уменьшение рисков прорастания на корню | [68] |
| <i>EGT2</i> | HORVU5Hr1G027890 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Улучшение роста корней | [3] |
| <i>HvMPK6</i> | BAK07440.1 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Снижение прорастания зерна, отсутствие побегов, короткие корни | [69] |
| <i>TaMBF1</i> | FJ800577 | <i>T. aestivum</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Повышение чувствительности к жаре | [98] |
| <i>FT-D1</i> | EF428114 | <i>T. aestivum</i> | Бомбардировка золотыми частицами незрелых зародышей | Увеличение числа колосков и удлинение времени цветения | [99] |
| <i>MORC6a</i> | HORVU3Hr1G046280.3 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Повышение устойчивости к биотрофным и некротрофным грибам | [45] |
| <i>HvARE1</i> | AK375792.1 | <i>H. vulgare</i> | Агробактериальная трансформация незрелых зародышей | Повышение эффективности использования азота | [88] |

ных культур. Гаплоидная стратегия на основе микроспор также вдвое снижает количество редактируемых аллелей. Например, у гексаплоидной пшеницы количество редактируемых аллелей уменьшается с шести до трех. Таким образом, относительная простота выделения и возможность быстрого получения гомозиготных диплоидных трансгенных растений за одну стадию делают одноклеточные микроспоры привлекательной мишенью для редактирования генома, особенно у устойчивых к трансформации видов, к которым относятся все виды Пшеницевых. Исходя из этих соображений, Bhowmik и соавт. [47] исследовали ряд факторов, которые могут повлиять на доставку компонентов CRISPR/Cas9 в микроспоры, и обнаружили, что электропорация не менее 75000 клеток с использованием 10–20 мкг ДНК и импульсного напряжения 500 В оптимальна для трансфекции микроспор мягкой пшеницы. С использованием нескольких конструкций Cas9 и нРНК удалось внести целевые модификации и выполнить нокаут генов *TaLox2* и *TaUbiL1*, кодирующих липоксигеназу и убиквитин [47].

Еще одна работа по геномному редактированию культуры пыльников проведена на растениях ячменя. В каллусах нескольких сортов ячменя, полученных из микроспор, методом агробактериальной трансформации удалось отредактировать ген фитендесатуразы (*HvPDS*) [82]. Этот протокол оказался более эффективным, чем агробактериальная трансформация незрелых зародышей. Предложен также подробный протокол геномного редактирования культуры клеток пыльников ячменя, который позволяет с помощью метода удвоения гаплоидов сразу создавать линии, гомозиготные по отредактированному аллелю [83].

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ ПОСЛЕ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

Существуют три основных метода выявления мутаций, индуцированных CRISPR/Cas: ПЦР/рестрикционный анализ (PCR/Re, CAPS), анализ с помощью нуклеазы T7E1 или ее аналогов, а также клонирование ампликонов с последующим секвенированием. Эти методы широко используются при геномном редактировании Пшеницевых. Обязательным условием первого метода является то, что локус-мишень должен включать сайт соответствующей рестриктазы, который нарушается мутациями, индуцированными CRISPR/Cas. В этом случае ампликоны с мутациями окажутся устойчивыми к расщеплению ферментами рестрикции и на электрофореграмме будут визуализироваться нерасщепленные ампликоны. Для этого проводят ПЦР-анализ целевых генов в предполагаемых трансформантах, после чего ампликоны расщепляют ферментом рестрикции, который распознает последовательности-мише-

ни дикого типа [15]. Мутантные аллели можно дополнительно анализировать путем клонирования в вектор и секвенирования нерасщепленных ампликонов [39]. ПЦР/рестрикционный анализ нельзя применять к локусу-мишени, в котором нет подходящих сайтов эндонуклеаз рестрикции. В качестве альтернативы можно использовать ферменты, расщепляющие неправильно спаренные участки ДНК. В геномном редактировании Пшеницевых широко используются нуклеазы T7E1 [65] и Cel I (SURVEYOR) [46]. Продукты ПЦР (смесь аллеля дикого типа и мутантного аллеля) сначала подвергают денатурации, а затем ренатурации для образования гетеродуплексов. Продукты реакции обрабатывают нуклеазами T7E1 или Cel I, а затем визуализируют при помощи электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Гетеродуплексы расщепляются T7E1/Cel I, тогда как гомодуплексы дикого типа и мутантные гомодуплексы остаются интактными [58]. Небольшие точечные мутации можно обнаружить с помощью ПЦР/рестрикционного анализа и подтвердить секвенированием. Поскольку сайты рестрикции часто нарушаются при мутациях, индуцированных при NHEJ и HDR, мутантные последовательности оказываются устойчивыми к расщеплению и предпочтительно амплифицируются в последующем цикле ПЦР. После этого отредактированный генотип можно подтвердить клонированием и секвенированием [15]. Можно использовать и полногеномное секвенирование отредактированных растений [48, 54], при котором выявляются также нецелевые участки геномного редактирования.

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ CRISPR/Cas ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ

Основные успехи были достигнуты при улучшении моно- или олигогенно контролируемых признаков, когда положительному проявлению признака препятствует ген – негативный регулятор. В этих случаях проблема решается нокаутом гена.

Одной из важнейших проблем при возделывании мягкой пшеницы является чувствительность этой культуры к мучнистой росе, вызываемой фитопатогенным грибом. Распространение мучнистой росы на посевах приводит к существенному снижению урожая. В пионерской работе по геномному редактированию мягкой пшеницы сделана попытка создания сортов, устойчивых к мучнистой росе, путем нокаута гена *TaMLO*, однако это привело к снижению урожайности у отредактированных растений [2]. Позднее проблему негативного плейотропного эффекта нокаута этого гена удалось решить с помощью небольшой

делении в локусе MLO-B1 [84]. Устойчивость пшеницы к мучнистой росе удалось повысить также путем внесения мутаций в ген *EDR1* [57]. Еще одно не менее опасное заболевание представителей трибы Пшеницевые – фузариоз, вызывается грибом *Fusarium graminearum*. Brauer и соавт. [34] идентифицировали ген *TaNFXL1*, кодирующий фактор транскрипции, индуцируемый микотоксином дезоксиниваленолом. С помощью CRISPR/Cas доказано, что продукт гена *TaNFXL1* подавляет устойчивость растений пшеницы к *F. graminearum*. Таким образом, нокаут гена *TaNFXL1* может повышать устойчивость мягкой пшеницы к фузариозу (табл. 1). Белки семейства Microchidia (MORC) играют важную роль в эпигенетическом сайленсинге генов и стабилизации генома в клетках растений и животных, а также действуют как медиаторы передачи сигналов защиты, запускаемой R-белками различных классов. Методом CRISPR/Cas получены двойные мутанты ячменя *hvmorc1/hvmorc6a* с высоким уровнем устойчивости к биотрофным (*Blumeria graminis*) и некротрофным (*F. graminearum*) фитопатогенным грибам [45].

Одну из серьезных проблем при возделывании Пшеницевых представляют многочисленные вирусные инфекции. С помощью технологии CRISPR/Cas можно воздействовать на гены самого растения, продукты которых важны для развития вирусной инфекции. К примеру, гены *Ta-eIF4E* и *Ta-eIF(iso)4E*, кодирующие высококонсервативные факторы инициации трансляции, одновременно служат факторами восприимчивости (S), необходимыми вирусам семейства *Potyviridae* для завершения жизненного цикла. Предполагается, что линии мягкой пшеницы с нокаутом генов *Ta-eIF4E* и *Ta-eIF(iso)4E* будут устойчивы к вирусу веретенообразной мозаики пшеницы (WSSMV) и вирусу желтой мозаики пшеницы (WYMV) [67]. Другой подход применили для борьбы против вируса WDV. Растения, постоянно экспрессирующие белок Cas и нРНК против WDV, характеризовались повышенной устойчивостью к данному вирусу [85].

Еще одну проблему при культивировании Пшеницевых представляют такие вредители, как тля. Растения защищаются от тли, закупоривая поврежденные ситовидные трубки отложениями каллозы. Однако эти вредители приобрели способность индуцировать растительные гены, кодирующие β -1,3-глюканазу, которая разлагает каллозу, что позволяет тле преодолевать защитные системы растения-хозяина. Чтобы повредить этот механизм, методом CRISPR/Cas получили нокаут двух генов β -1,3-глюканазы (1636 и 1639) в геноме ячменя [86]. В трех из четырех двойных мутантных линий выявили значительное снижение активности β -1,3-глюканазы, причем листья двойных мутантов содержали гораздо больше

каллозы, чем листья контрольных растений или одинарных мутантов. Однако при этом у мутантных растений не повышалась устойчивость к тле *Rhopalosiphum padi* L., что могло быть связано с более высоким уровнем экспрессии третьего гена β -1,3-глюканазы – 1637, который тоже активируется под влиянием патогена.

Дефицит влаги, вызванный засухой и гипотермией, остается наиболее значимым абиотическим стрессовым фактором при выращивании всех сельскохозяйственных культур. Для повышения стрессоустойчивости пшеницы использовали нокаут генов *TaDREB2* и *TaERF3*, кодирующих факторы транскрипции, которые регулируют чувствительность к обезвоживанию [58]. Эти эксперименты проведены только на протопластах, однако предполагается, что полноценные растения будут отличаться повышенной устойчивостью к дефициту влаги.

Одной из важных причин снижения урожайности Пшеницевых остается так называемое прорастание на корню (прорастание зерновок в колосе). Методом CRISPR/Cas Abe и соавт. [48] внесли мутации в три гомеолога гена *Qsd1*, участвующих в контроле покоя семян. Путем дальнейших скрещиваний удалось получить отредактированные растения, семена которых, как полагают, будут иметь более продолжительный период покоя и будут менее подвержены прорастанию на корню. Нокаут гена *Qsd1* использовали также в работе, направленной на отработку технологии геномного редактирования путем генетической трансформации апикальной меристемы побега *in planta* [68]. Проблема прорастания на корню особенно актуальна для тритикале. Однако, учитывая сложность генома, слабую изученность и очень низкие способности тритикале к регенерации, геномное редактирование этой культуры требует больших затрат и времени, его проводят лишь в нескольких лабораториях мира [87]. Одной из вероятных генетических детерминант прорастания на корню считается ген *ABA 8'-HYDROXYLASE 1*. Michalski и соавт. [49] создали конструкции для нокаута этого гена методом CRISPR/Cas и испытали их путем трансфекции в протопласты тритикале. Далее с помощью анализа T7E1 и секвенирования доказали возникновение мутаций в целевом гене. Это единственная на сегодняшний день работа по геномному редактированию тритикале, однако следует отметить, что полноценные растения получены не были [49].

Со времен первой зеленой революции одним из хозяйственно ценных признаков Пшеницевых остается короткостебельность. Поэтому не удивительно, что этот фенотипический признак становится целью геномного редактирования. Например, с использованием гаплоиндукторов получены

растения мягкой и твердой пшеницы с нокаутом генов *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BR1)* и *SEMI-DWARF 1 (SD1)* [81]. Предполагается, что отредактированные растения будут иметь более короткий стебель и увеличенную урожайность.

Важным направлением селекции культурных растений трибы Пшеницевые остается повышение эффективности азотного питания. Недавно Zhang и соавт. [65] идентифицировали и охарактеризовали три гомеолога гена *TaARE1*. Методом CRISPR/Cas они создали мутантные линии пшеницы с тройными нулевыми аллелями *taare*. Все мутантные линии имели повышенную устойчивость к азотному голоданию, замедленное старение и повышенную урожайность в полевых условиях. Похожие работы проведены также на ячмене. У мутантных линий ячменя *hvae1* наблюдалось увеличение высоты растений, числа побегов, содержания белка в зерне и урожайности. Кроме того, мутанты ячменя *hvae1* отличались повышенным содержанием хлорофилла, отсроченным старением, а также имели высокое содержание азота в побегах в условиях низкого содержания азота в почве [88].

К важнейшим характеристикам урожайности культурных растений трибы Пшеницевые относятся масса и размеры семян. Показано увеличение ширины и массы зерновок в растениях с нокаутом гомеологов гена *TaGW7* в геномах В и D, при этом наблюдалось уменьшение длины зерновок. Причем наиболее значительные эффекты получены при внесении изменений в оба гомеолога [60]. Нокаут гомологичного гена *TaGW2* во всех субгеномах мягкой пшеницы также способствовал увеличению признака “масса тысячи зерен” [32].

Некоторые работы по редактированию с помощью системы CRISPR/Cas направлены на улучшение качества зерна. Например, Li и соавт. [1] получили линии яровой и озимой пшеницы мягкой с высоким содержанием амилозы за счет внесения мутаций в ген *TaSBEIIa*, кодирующий ветвящийся фермент крахмала. Блокирование экспрессии этого гена привело к снижению содержания амилопектина в крахмале и увеличению содержания амилозы. Raffan и соавт. [66] удалось внести мутационные изменения во все шесть аллелей гена *TaASN2*, кодирующего аспарагинсинтетазу, что привело к существенному снижению содержания свободного аспарагина в зерне пшеницы мягкой. Свободный аспарагин является предшественником акриламида, который образуется во время высокотемпературной обработки продуктов, приготовленных из пшеницы, поэтому предполагается возможность снижения канцерогенности продуктов из растений с отредактированным геномом.

Инозитолтрифосфат-киназы 5/6 (ИТРК) составляют небольшую группу ферментов, участву-

ющих в последовательном фосфорилировании инозитолфосфата в инозитолгексафосфат (IP6), который является основной формой хранения фосфата в зерне злаков. Создание линий Пшеницевых с пониженным содержанием IP6 может повысить биодоступность фосфатов в пище и кормах. С целью выяснения роли гена *HvITPK1* в биосинтезе IP6 созданы мутантные растения ячменя [89] с измененными уровнями фосфатов в зрелых зернах — от 65 до 174% относительно содержания в зерновках дикого типа. К тому же мутанты с инсерциями были более солеустойчивыми, чем растения дикого типа и делеционные мутанты. Результаты этого исследования доказывают участие генов *ITPK* не только в накоплении фосфатов, но и в передаче сигналов абиотического стресса.

Более 7% населения западных стран страдает повышенной чувствительностью к глютену, а наибольшей иммунореактивностью обладает 33-мерный пептид α -глиадины [56]. С целью создания растений мягкой и твердой пшеницы с пониженной иммунореактивностью сконструированы две нРНК для нацеливания на консервативную область, примыкающую к последовательности гена α -глиадины, кодирующей 33-мер. Мутантные линии характеризовались снижением содержания α -глиадинов и иммунореактивности [56]. С пшеницей связаны и такие заболевания человека, как астма пекарей и нецелиакийная чувствительность к пшенице (NCWS). Предполагается, что патогенез этих болезней связан с ингибиторами α -амилазы и трипсина (АТІ), кодируемыми субъединицами WTAI-СМ3 и WTAI-СМ16. С целью получения линий твердой пшеницы с уменьшенным количеством потенциальных аллергенов проведено редактирование этих двух субъединиц в зерне итальянского сорта Svevo с использованием стратегии мультиплексного CRISPR/Cas9 [64]. В итоге редактирование двух целевых генов подтверждено как на молекулярном (секвенирование и исследование экспрессии генов), так и на биохимическом (иммунологический тест) уровнях.

Для пивоварения предпочтительно использовать ячмень с низким содержанием (1,3;1,4)- β -глюкана. Так как гены (1,3;1,4)- β -глюкансинтазы ячменя изучены недостаточно, методом CRISPR/Cas выполнен нокаут четырех генов (*HvCslH1*, *HvCslF3*, *HvCslF6* и *HvCslF9*), предположительно кодирующих ферменты семейства гликозилтрансфераз GT2 [90]. Мутации в генах *HvCslH1*, *HvCslF3* и *HvCslF9* не влияли на содержание (1,3;1,4)- β -глюкана в зерне, тогда как нокаут гена *HvCslF6* приводил к существенному уменьшению содержания этого вещества.

Гордеины — запасные белки ячменя, одна из фракций которых, называемая D-гордеинами, ассоциирована с низким качеством солодового экстракта. При этом механизм отрицательного

влияния D-гордеина на качество солода не установлен. С целью функционального анализа гена D-гордеина проведен его нокаут и получены три гетерозиготных мутантных растения [91]. Гомозиготные мутанты второго поколения имели более мелкие зерновки, содержание проламинов в них было снижено, а глютеинов увеличено.

Голозерность ячменя связывают с делецией гена *NUD*, кодирующего транскрипционный фактор AP2/ERF, контролирующий образование цементирующего слоя между околоплодником, нижней и верхней цветковой чешуями. Правильность этих данных подтверждает конверсия фенотипа ячменя из пленчатого в голозерный при направленном нокауте гена *NUD* с использованием РНК-управляемой эндонуклеазы Cas9 [92]. Отмечается, что из-за высокого содержания β -глюкана голозерный ячмень может считаться диетическим продуктом.

В ряде работ проведено одновременное мультиплексное геномное редактирование нескольких генов. Множественные спейсеры в одной нРНК получали, используя классическую мультиплексную систему, где каждая нРНК находится под контролем собственного промотора U3 или U6 (система TRSP), а также ряд систем процессинга тРНК [53], рибозимов [93] и Csy4 [54], экспрессирующихся полицистронно. Для проверки эффективности этих систем Li и соавт. [1] проводили одновременное геномное редактирование генов *TaDA1*, *TaPDS* и *TaNCED1* с использованием первых трех подходов. В итоге системы процессинга тРНК и рибозимов оказались более эффективными и надежными, чем система TRSP. Luo и соавт. [41] разработали эффективную стратегию мультиплексного редактирования генома пшеницы мягкой с использованием промотора Pol II риса для управления экспрессией tandemных повторов единиц тРНК-нРНК, добавив полиА-сигнал и pos-терминатор для повышения уровня экспрессии транскриптов, что увеличивало частоту редактирования множественных генов в нескольких локусах пшеницы. Показана возможность одновременного редактирования 2, 3, 4 и 5 генов в 15 геномных локусах в одном поколении. Одновременно проведено редактирование генов *Pinb*, *Waxy* и *DA1*, мутации в которых могут способствовать повышению твердозерности, увеличению содержания амилопектина и увеличению показателя “масса тысячи зерен” соответственно [38]. Wang и соавт. [33] применили мультиплексную конструкцию, созданную путем объединения tandemно расположенных единиц тРНК-нРНК, для создания наследуемых мутаций в генах *TaGW2*, *TaLpx-1* и *TaMLO* гексаплоидной пшеницы. Образовавшиеся во всех трех гомеологичных копиях гена *TaGW2* мутации привели к значительному увеличению размера зерновок и показателя “масса тысячи зерен”.

Системы мультиплексного геномного редактирования также были апробированы на ячмене. Сконструировали две разные нРНК для обычного редактирования и одну полицистронную конструкцию тРНК-нРНК для мультиплексного редактирования с использованием эндогенной системы процессинга тРНК для нокаута генов цитоксиноксидазы/дегидрогеназы: одного — *HvCKX1*, и двух — *HvCKX1* и *HvCKX3* соответственно [94]. Сообщается также, что высокая частота индуцированных мутаций была достигнута за счет использования оптимизированного синтетического гена *Cas9* и усиленного интроном UBQ10-i1 из *A. thaliana* в сочетании с эффективным методом агробактериальной трансформации. В дальнейшем Gasparis и соавт. [95] продолжили исследование растений ячменя с нокаутом и выявили значительное снижение активности фермента СКХ в колосьях линий *ckx1*, в то время как у линий *ckx3* активность оставалась на том же уровне, что и в контрольных растениях. Несмотря на эти различия, урожайность мутантных линий не изменилась. В свою очередь, различия в активности СКХ в корнях мутантов *ckx1* и *ckx3* отражались на морфологии корней. Снижение активности СКХ в линии *ckx1* приводило к увеличению длины корней, площади поверхности и количества корневых волосков и к противоположным результатам у мутантов *ckx3*.

Очень удобным инструментом, используемым в селекционных работах, являются системы индукции мужской стерильности. С целью индукции мужской стерильности отредактировали все три гомеолога гена *TaNPI*, кодирующего предполагаемую глюкозаметанол-холинксидоредуктазу, необходимую для поддержания мужской фертильности (табл. 1). Тройные гомозиготные мутации в генах *TaNPI* приводили к полной мужской стерильности [39]. Редактированные линии пшениц с мужской стерильностью предлагают использовать в селекции пшеницы. В другом исследовании путем направленного мутагенеза с использованием системы CRISPR/Cas мутации внесли во все три гомеолога гена *Ms45* (ген мужской стерильности) и получили стерильные растения пшеницы мягкой [96]. Однако после получения гибридных линий возникает необходимость восстановления мужской фертильности, что можно сделать путем нокаута генов мужской стерильности. К примеру, Tang и соавт. [63] внесли мутации в ген *Ms2*, контролирующей цитоплазматическую мужскую стерильность, что привело к восстановлению фертильности у отредактированных растений. В табл. 1 представлена информация о целевых генах, методах доставки компонентов CRISPR/Cas и фенотипических проявлениях нокаута этих генов в растениях мягкой и твердой пшеницы, ячменя и тритикале. Результа-

ты геномного редактирования других представителей трибы Пшеницевые пока не опубликованы.

МЕТОД CRISPR/Cas В ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ

Пшеница мягкая имеет большой (17 Гб) и сложный полиплоидный геном с высокой долей повторяющихся последовательностей (>80%). Эти особенности создают проблемы для генетического и функционального анализа генома пшеницы [2, 38]. Однако с появлением системы CRISPR/Cas гораздо быстрее начали развиваться фундаментальные исследования пшеницы мягкой и других Пшеницевых методами обратной генетики. На сегодняшний день опубликовано уже более 10 работ, в которых представлены результаты изучения Пшеницевых с использованием мутантов с нокаутом определенных генов, полученных методом CRISPR/Cas. К примеру, Wang и соавт. [100] получили мутанты пшеницы по гену *TaPHT1;9-4B*, которые при достаточном количестве фосфатов в почве содержат меньше фосфатов в корнях и побегах, чем растения дикого типа. В то же время при дефиците фосфора эти мутанты накапливали фосфаты в корнях, но не в побегах. Таким образом доказано, что продукт гена *TaPHT1;9-4B* участвует в переносе фосфатов от корней к побегу. Путем нокаута гена гистон-ацетилтрансферазы *TaHAG1* методом CRISPR/Cas доказана его важная роль в регуляции солеустойчивости посредством ацетилирования гистонов H3 различных генов, участвующих в модуляции выработки активных форм кислорода [97].

Для изучения роли гена *TaMBF1* в регуляции и обеспечении жароустойчивости методом CRISPR/Cas созданы растения с нокаутом всех трех гомеологичных генов [98]. Мутантные растения, в отличие от растений дикого типа, характеризовались пониженной устойчивостью к действию высоких температур — в условиях теплового стресса они имели более короткий стебель и меньшую сырую массу. Однако нокаут только одного гомеолога *TaMBF1* не привел к существенному изменению жароустойчивости, что свидетельствует о функциональной избыточности гомеологов этого гена в ответе на тепловой стресс. Ген *TaBAK1-2* мягкой пшеницы является гомологом гена *BAK1 A. thaliana*, кодирующего BRI1-ассоциированную рецепторную киназу 1, важный регулятор иммунитета и развития растений. Для выяснения функций гена *TaBAK1-2* использовали нокаут всех трех его гомеологов; эта мутация успешно наследовалась в последующих поколениях [67].

Продукт гена *FLOWERING LOCUS T (FT)* способен перемещаться из флоэмы листа в апикальную меристему побега, где инициирует переход к

цветению. Предполагается, что данный ген также может участвовать в регуляции числа колосков у Пшеницевых. Путем редактирования гена *FT-D1* с использованием системы CRISPR/Cas доказано участие этого гена в определении числа колосков и времени колошения [99].

Угол роста корней определяет их направление к вектору силы тяжести и является одним из наиболее важных факторов, устанавливающих архитектуру корневой системы. Путем нокаута гомеологов гена *EGT2* в субгеномах А и В твердой пшеницы показана эволюционно консервативная роль этого гена в контроле угла роста корней [3]. Применение микродиссекции с лазерным захватом и секвенирования РНК позволило обнаружить, что в растениях с нокаутом этого гена подавлена экспрессия семи генов экспансинов в зоне растяжения. Эти данные свидетельствуют о том, что *EGT2* кодирует регулятор угла роста корней, который может быть ценной мишенью для улучшения роста корней у Пшеницевых.

Среди культурных видов трибы Пшеницевые наиболее удобным для проведения фундаментальных исследований оказался ячмень, имеющий диплоидный геном. На модельных сортах этого вида хорошо отработана методика генетической трансформации. Чтобы изучить механизм модификации и удаления N-гликанов из белков, Karusi и соавт. [27] выбрали в качестве мишени для редактирования генома предполагаемый эндогенный ген эндо-N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (ENGase) ячменя. В зерновках ячменя при прорастании активируется ENGase, которая способствует удалению N-гликанов из молекул белка, что приводит к мобилизации запасных гликопротеинов. Редактированные растения ячменя с биаллельными или гомозиготными мутациями в предполагаемом гене ENGase не имели фенотипических отличий от растений дикого типа. Планируется провести биохимический анализ полученных растений, чтобы выявить возможные изменения в составе N-гликанов эндогенных и рекомбинантных белков, а также воздействие этих мутаций на физиологию эндосперма. Другой пример — особенности биосинтеза витамина Е у однодольных растений. С целью изучения биосинтеза этого витамина созданы мутантные растения ячменя с нокаутом генов *HvHPT* и *HvHGGT*, кодирующих ферменты, вовлеченные в биосинтез витамина Е [35]. С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) показано, что целенаправленная мутация гена *HvHPT* значительно снижает содержание как токоферолов, так и токотриенолов, тогда как мутация гена *HvHGGT* полностью блокирует биосинтез токотриенолов в зернах ячменя. Это означает, что продукт гена *HvHGGT* является ключевым ферментом биосинтеза токотриенолов.

Гены *MPK*, роль которых в развитии растений хорошо изучена у *A. thaliana* и риса, кодируют митоген-активируемые протеинкиназы. При этом функции ортологов гена *MPK6* у Пшеницевых оставались неизученными. Kgenek и соавт. [69] методом CRISPR/Cas создали растения ячменя с нокаутом гена *HvMPK6*, однако фенотипически они не отличались от растений дикого типа. Показано, что все эти мутанты гетерозиготные, а второй аллель всегда содержит нативный ген *HvMPK6*. Полученные результаты говорят о летальности биаллельных мутантов. В дальнейшем удалось получить семена этих мутантов, однако проростки оказались аномальными, без побегов и с редуцированной корневой системой. Исходя из полученных результатов, а также результатов изучения ортологов гена *MPK6* в *A. thaliana* и риса, сделан вывод о важной роли *HvMPK6* в эмбриональном и раннем развитии проростков ячменя.

Геномное редактирование CRISPR/Cas может оказаться весьма полезным при функциональном анализе промоторов различных генов растений. К примеру, с помощью этого подхода анализировали промотор гена фитазы ячменя *HvPAPhy_a*. Белковый продукт этого гена, как предполагалось, является основной фитазой, присутствующей в зрелых зерновках ячменя и определяющей их фитазную активность (MGPA) [43]. Результаты этой работы подтвердили, что фермент *PAPhy_a* ячменя вносит основной вклад в MGPA. Кроме того, анализ промоторной области гена *HvPAPhy_a*, содержащей мотив GCN4/Skn1/Ry, показал его важность для экспрессии *HvPAPhy_a*, поскольку MGPA в зерновках линий растений с мутациями в этом мотиве значительно снижена. Интересно, что в линиях ячменя с делециями нуклеотидов в промоторе, расположенными ниже этого мотива, уровни MGPA еще более снижены, указывая на то, что мотив GCN4/Skn1/Ry не является единственным элементом промотора, ответственным за уровень экспрессии *PAPhy_a* во время созревания зерна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение системы CRISPR/Cas9 имеет широкие перспективы как в фундаментальных исследованиях, так и для решения прикладных задач. Одна из таких перспектив – возможность значительного ускорения многих исследований, связанных с выяснением функций генов и генетического контроля признаков. С помощью метода CRISPR/Cas получено большое количество растений пшеницы мягкой и ячменя, в том числе, с улучшенными хозяйственно ценными признаками. Опубликованы результаты геномного редактирования пшеницы твердой и тритикале [46, 49, 56, 64, 81]. Однако целый ряд культурных растений трибы Пшеницевые, таких как рожь, пше-

ницы-однозернянки и пшеницы-двухзернянки, остаются неисследованными в контексте геномного редактирования. Тем не менее, недавние успехи в генной инженерии и генетической трансформации этих видов [101–103] позволяют надеяться на скорое вовлечение новых представителей трибы Пшеницевые в исследования, предполагающие изменение генома с помощью систем CRISPR/Cas. Одним из существенных препятствий к широкому применению методов CRISPR/Cas остается крайне низкая способность представителей трибы Пшеницевые к регенерации. Поэтому возрастает актуальность разработки новых способов доставки компонентов системы CRISPR/Cas, в том числе, в апикальную меристему или в пыльцевые зерна, чтобы получить полноценные растения с отредактированными геномами без этапа культивирования *in vitro*. Разработка таких методов позволит проводить геномное редактирование не только на модельных, но и на коммерчески значимых сортах.

В России систему CRISPR/Cas9 успешно применяют для редактирования генома ячменя в Институте цитологии и генетики СО РАН [92, 104]. Геном мягкой пшеницы редактируют сотрудники Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии [105]. Однако отредактированные растения в сельскохозяйственном производстве нашей страны пока не применяются. Одну из проблем представляет присутствие в геномах трансгенных растений “служебной” чужеродной ДНК. Система CRISPR/Cas позволяет удалять нежелательные последовательности из генома, поэтому отредактированные растения не могут относиться к ГМО, так как не содержат трансгенов, что позволяет в случае диверсифицированного подхода в сфере правового регулирования допускать к использованию сорта, в ходе получения которых применялось геномное редактирование.

Обзорное исследование Кулуева Б.Р., Михайловой Е.В., Галимовой А.А. и Хлесткиной Е.К. поддержано грантом Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.), работы Кулуева А.Р. и Заикиной Е.А. выполнены в рамках государственного задания № 122030200143-8.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Li J., Jiao G., Sun Y., Chen J., Zhong Y., Yan L., Jiang D., Ma Y., Xia L. (2021) Modification of starch composition, structure and properties through editing of *TaSBEIIa* in both winter and spring wheat varieties

- by CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* **19**, 937–951. <https://doi.org/10.1111/pbi.13519>
2. Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.* **32**, 947–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
 3. Kirschner G.K., Rosignoli S., Guo L., Vardanega I., Imani J., Altmuller J., Milner S.G., Balzano R., Nagel K.A., Pflugfelder D., Forestan C., Bovina R., Koller R., Stocker T.G., Mascher M., Simmonds J., Uauy C., Schoof H., Tuberosa R., Salvi S., Hochholdinger F. (2021) *ENHANCED GRAVITROPISM 2* encodes a *STERILE ALPHA MOTIF*-containing protein that controls root growth angle in barley and wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **31**, e2101526118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101526118>
 4. Хлесткина Е.К. (2022) Стратегия новой “зеленой революции” в селекции пшеницы: к юбилею академика РАН Людмилы Андреевны Беспаловой. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции.* **183**, 254–258. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2022-1->
 5. Герасимова С.В., Хлесткина Е.К., Кочетов А.В., Шумный В.К. (2017) Система CRISPR/Cas9 для редактирования геномов и особенности ее применения на однодольных растениях. *Физиол. растений.* **64**, 92–108. <https://doi.org/10.7868/S0015330317010079>
 6. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Ясыбаева Г.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. (2017) Эволюция методов редактирования геномов. *Биомика.* **9**, 243–250.
 7. Колчанов Н.А., Кочетов А.В., Салина Е.А., Першина Л.А., Хлесткина Е.К., Шумный В.К. (2017) Состояние и перспективы использования маркер-ориентированной и геномной селекции растений. *Вест. Рос. Акад. Наук.* **87**, 348–354. <https://doi.org/10.7868/S0869587317040107>
 8. Hensel G. (2020) Genetic transformation of Triticeae cereals – summary of almost three-decade’s development. *Biotechnol. Adv.* **40**, 107484. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107484>
 9. Cheng M., Fry J.E., Pang S., Zhou H., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T.W., Wan Y. (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* **115**, 971–980. <https://doi.org/10.1104/pp.115.3.971>
 10. Kumlehn J., Serazetdinova L., Hensel G., Becker D., Loerz H. (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol. J.* **4**, 251–261. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00178.x>
 11. Hensel G., Valkov V., Middlefell-Williams J., Kumlehn J. (2008) Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions. *J. Plant Physiol.* **165**, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.015>
 12. Harwood W.A. (2012) Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. *J. Exp. Bot.* **63**, 1791–1798. <https://doi.org/10.1093/jxb/err380>
 13. Hisano H., Meints B., Moscou M.J., Cistue L., Echávarri B., Sato K., Hayes P.M. (2017) Selection of transformation-efficient barley genotypes based on TFA (transformation amenability) haplotype and higher resolution mapping of the TFA loci. *Plant Cell Rep.* **36**, 611–620. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2107-2>
 14. Ran Y., Patron N., Kay P., Wong D., Buchanan M., Cao Y.Y., Sawbridge T., Davies J.P., Mason J., Webb S.R., Spangenberg G., Ainley W.M., Walsh T.A., Hayden M.J. (2018) Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template. *Plant Biotechnol. J.* **16**, 2088–2101. <https://doi.org/10.1111/pbi.12941>
 15. Shan Q., Wang Y., Li J., Gao C. (2014) Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat. Protoc.* **9**, 2395–2410. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.157>
 16. Михайлова Е.В., Хуснутдинов Э.А., Чемерис А.В., Кулуев Б.Р. (2022) Доступный арсенал систем CRISPR/Cas для геномного редактирования растений. *Физиол. растений.* **69**, 38–53. <https://doi.org/10.31857/S0015330322010134>
 17. Ming M., Ren Q., Pan C., He Y., Zhang Y., Liu S., Qi Y. (2020) CRISPR-Cas12b enables efficient plant genome engineering. *Nat. Plants.* **6**, 202. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0614-6>
 18. Lawrenson T., Harwood W.A. (2019) Creating targeted gene knockouts in barley using CRISPR/Cas9. *Meth. Mol. Biol.* **1900**, 217–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8944-7_14
 19. Kumar R., Kaur A., Pandey A., Mamrutha H.M., Singh G.P. (2019) CRISPR-based genome editing in wheat: a comprehensive review and future prospects. *Mol. Biol. Rep.* **46**, 3557–3569. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04761-3>
 20. Li S., Zhang C., Li J., Yan L., Wang N., Xia L. (2021) Present and future prospects for wheat improvement through genome editing and advanced technologies. *Plant Commun.* **2**. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100211>
 21. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Кулуев Б.Р., Рожнова Н.А., Матнязов Р.Т., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. (2017) Биоинформатические ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов. *Биомика.* **9**, 202–226.
 22. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Гумерова Г.Р., Князев А.В., Вершинина З.Р., Михайлова Е.В., Чемерис Д.А., Матнязов Р.Т., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. (2020) Дизайн РНК-гидов для CRISPR/CAS редактирования геномов растений. *Молекуляр. биология.* **54**, 29–50. <https://doi.org/10.1134/S0026898420010061>

23. Heigwer F., Kerr G., Boutros M. (2014) E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat. Methods*. **11**, 122–123.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2812>
24. Naito Y., Hino K., Bono H., Ui-Tei K. (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*. **31**, 1120–1123.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>
25. Hough S.H., Kancleris K., Brody L., Humphryes-Kirilov N., Wolanski J., Dunaway K., Ajetunmobi A., Dillard V. (2017) Guide Picker is a comprehensive design tool for visualizing and selecting guides for CRISPR experiments. *BMC Bioinformatics*. **18**, 167.
<https://doi.org/10.1186/s12859-017-1581-4>
26. Singh R., Kuscu C., Quinlan A., Qi Y., Adli M. (2015) Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. *Nucl. Acids Res.* **43**, e118.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv575>
27. Kapusi E., Corcuera-Gomez M., Melnik S., Stoger E. (2017) Heritable genomic fragment deletions and small indels in the putative ENGase gene induced by CRISPR/Cas9 in barley. *Front. Plant Sci.* **8**, 540.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00540>
28. Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., Zhang H.Y., Han C.Y., Liu B., Wang X.C., Chen Q.J. (2014) A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* **14**, 327.
<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
29. Mikami M., Toki S., Endo M. (2015) Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol. Biol.* **88**, 561–572.
<https://doi.org/10.1007/s11103-015-0342-x>
30. Upadhyay S.K., Kumar J., Alok A., Tuli R. (2013) RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda)*. **3**, 2233–2238.
<https://doi.org/10.1534/g3.113.008847>
31. Gil-Humanes J., Wang Y., Liang Z., Shan Q., Ozuna C.V., Sanchez-Leon S., Baltes N.J., Starker C., Barro F., Gao C., Voytas D.F. (2017) High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant J.* **89**, 1251–1262.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13446>
32. Wang W., Simmonds J., Pan Q., Davidson D., He F., Battal A., Akhunova A., Trick H.N., Uauy C., Akhunov E. (2018) Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of *TaGW2* homoeologues to grain size and weight in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **131**, 2463–2475.
<https://doi.org/10.1007/s00122-018-3166-7>
33. Wang W., Pan Q., He F., Akhunova A., Chao S., Trick H., Akhunov E. (2018) Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. *CRISPR J.* **1**, 65–74.
<https://doi.org/10.1089/crispr.2017.0010>
34. Brauer E.K., Balcerzak M., Rocheleau H., Leung W., Scherthaner J., Subramaniam R., Ouellet T. (2020) Genome editing of a deoxynivalenol-induced transcription factor confers resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* **33**, 553–560.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-11-19-0332-R>
35. Zeng Z., Han N., Liu C., Buerte B., Zhou C., Chen J., Wang M., Zhang Y., Tang Y., Zhu M., Wang J., Yang Y., Bian H. (2020) Functional dissection of *HGGT* and *HPT* in barley vitamin E biosynthesis via CRISPR/Cas9-enabled genome editing. *Ann. Bot.* **126**, 929–942.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcaa115>
36. Dayani S., Sabzalian M.R., Mazaheri-Tirani M. (2019) CRISPR/Cas9 genome editing in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic improvement. In: *Advances in Plant Breeding Strategies: Cereals*. Eds Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. Cham. Springer, pp. 453–469.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-23108-8_12
37. Liu H., Wang K., Jia Z., Gong Q., Lin Z., Du L., Pei X., Ye X. (2020) Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of *TaMTL* using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system. *J. Exp. Botany*. **71**, 1337–1349.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz529>
38. Zhang S., Zhang R., Song G., Gao J., Li W., Han X., Chen M., Li Y., Li G. (2018) Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC Plant Biol.* **18**, 302.
<https://doi.org/10.1186/s12870-018-1496-x>
39. Li J., Wang Z., He G., Ma L., Deng X.W. (2020) CRISPR/Cas9-mediated disruption of *TaNPI* genes results in complete male sterility in bread wheat. *J. Genet. Genomics*. **47**, 263–272.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.05.004>
40. Li J., Zhang S., Zhang R., Gao J., Qi Y., Song G., Li W., Li Y., Li G. (2021) Efficient multiplex genome editing by CRISPR/Cas9 in common wheat. *Plant Biotechnol. J.* **19**, 427–429.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13508>
41. Luo J., Li S., Xu J., Yan L., Ma Y., Xia L. (2021) Pyramiding favorable alleles in an elite wheat variety in one generation by CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing. *Mol. Plant*. **14**, 847–850.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.03.024>
42. Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Ostergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. (2015) Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol.* **16**, 258.
<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0826-7>
43. Holme I.B., Wendt T., Gil-Humanes J., Deleuran L.C., Starker C.G., Voytas D.F., Brinch-Pedersen H. (2017) Evaluation of the mature grain phytase candidate *HvPAPhy_a* gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs. *Plant Mol. Biol.* **95**, 111–121.
<https://doi.org/10.1007/s11103-017-0640-6>
44. Kumar N., Galli M., Ordon J., Stuttmann J., Kogel K.H., Imani J. (2018) Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9

- gene-editing system. *Plant Biotechnol. J.* **16**, 1892–1903. <https://doi.org/10.1111/pbi.12924>
45. Galli M., Martiny E., Imani J., Kumar N., Koch A., Steinbrenner J., Kogel K.H. (2022) CRISPR/SpCas9-mediated double knockout of barley *Microorchidia MORC1* and *MORC6a* reveals their strong involvement in plant immunity, transcriptional gene silencing and plant growth. *Plant Biotechnol. J.* **20**, 89–102. <https://doi.org/10.1111/pbi.13697>
 46. Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang Y., Liu J., Chen K., Qiu J.L., Gao C. (2016) Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat. Commun.* **7**, 12617. <https://doi.org/10.1038/ncomms12617>
 47. Bhowmik P., Ellison E., Polley B., Bollina V., Kulkarni M., Ghanbarnia K., Song H., Gao C., Voytas D.F., Kagale S. (2018) Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9. *Sci. Rept.* **8**, 6502. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24690-8>
 48. Abe F., Haque E., Hisano H., Tanaka T., Kamiya Y., Mikami M., Kawaura K., Endo M., Onishi K., Hayashi T., Sato K. (2019) Genome-edited triple-recessive mutation alters seed dormancy in wheat. *Cell Rep.* **28**, 1362–1369.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.090>
 49. Michalski K., Hertig C., Mankowski D.R., Kumlehn J., Zimny J., Linkiewicz A.M. (2021) Functional validation of Cas9/guideRNA constructs for site-directed mutagenesis of triticale *ABA8'OH1* loci. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 7038. <https://doi.org/10.3390/ijms22137038>
 50. Furtado A., Henry R.J., Pellegrineschi A. (2009) Analysis of promoters in transgenic barley and wheat. *Plant Biotechnol. J.* **7**, 240–253. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00394.x>
 51. Hill-Ambroz K.L., Troy Weeks J., Baenziger P.S., Graybosch R.A. (2001) Constitutive promoter expression of transgenes in wheat (*Triticum aestivum*). *Cereal Res. Commun.* **29**, 9–16. <https://doi.org/10.1007/BF03543636>
 52. Al-Saady N.A., Torbert K.A., Smith L., Makarevitch I., Baldridge G., Zeyen R.G., Muehlbauer G.J., Olszewski N.E., Somers D.A. (2004) Tissue specificity of the *Sugarcane Bacilliform Virus* promoter in oat, barley and wheat. *Mol. Breed.* **14**, 331–338. <https://doi.org/10.1023/B:MOLB.0000049214.82160.9d>
 53. Xie K., Minkenberg B., Yang Y. (2015) Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, 3570–3575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420294112>
 54. Cermak T., Curtin S.J., Gil-Humanes J., Čegan R., Kono T.J.Y., Konecna E., Belanto J.J., Starker C.G., Mathre J.W., Greenstein R.L., Voytas D.F. (2017) A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. *Plant Cell.* **29**, 1196–1217. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>
 55. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y.G. (2015) A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant.* **8**, 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
 56. Sanchez-Leon S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Gimenez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* **16**, 902–910. <https://doi.org/10.1111/pbi.12837>
 57. Zhang Y., Bai Y., Wu G., Zou S., Chen Y., Gao C., Tang D. (2017) Simultaneous modification of three homologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J.* **91**, 714–724. <https://doi.org/10.1111/tpj.13599>
 58. Kim D., Alptekin B., Budak H. (2018) CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Funct. Integr. Genomics.* **18**, 31–41. <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0572-x>
 59. Hamada H., Liu Y., Nagira Y., Miki R., Taoka N., Imai R. (2018) Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Sci. Rept.* **8**, 14422. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32714-6>
 60. Wang W., Pan Q., Tian B., He F., Chen Y., Bai G., Akhunova A., Trick H.N., Akhunov E. (2019) Gene editing of the wheat homologs of *TONNEAU1*-recruiting motif encoding gene affects grain shape and weight in wheat. *Plant J.* **100**, 251–264. <https://doi.org/10.1111/tpj.14440>
 61. Zhang Z., Hua L., Gupta A., Tricoli D., Edwards K.J., Yang B., Li W. (2019) Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnol. J.* **17**, 1623–1635. <https://doi.org/10.1111/pbi.13088>
 62. Liu H., Wang K., Tang H., Gong Q., Du L., Pei X., Ye X. (2020) CRISPR/Cas9 editing of wheat *TaQ* genes alters spike morphogenesis and grain threshability. *J. Genetics Genomics.* **47**, 563–575. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.08.004>
 63. Tang H., Liu H., Zhou Y., Liu H., Du L., Wang K., Ye X. (2021) Fertility recovery of wheat male sterility controlled by Ms2 using CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* **19**, 224–226. <https://doi.org/10.1111/pbi.13482>
 64. Camerlengo F., Frittelli A., Sparks C., Doherty A., Martignago D., Larre C., Lupi R., Sestili F., Masci S. (2020) CRISPR-Cas9 multiplex editing of the α -amylase/trypsin inhibitor genes to reduce allergen proteins in durum wheat. *Front. Sustain. Food Syst.* **4**, 104. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00104>
 65. Zhang J., Zhang H., Li S., Li J., Yan L., Xia L. (2021) Increasing yield potential through manipulating of an *ARE1* ortholog related to nitrogen use efficiency in wheat by CRISPR/Cas9. *J. Integr. Plant Biol.* **63**, 1649–1663. <https://doi.org/10.1111/jipb.13151>
 66. Raffan S., Sparks C., Huttly A., Hyde L., Martignago D., Mead A., Hanley S.J., Wilkinson P.A., Barker G., Ed-

- wards K.J., Curtis T.Y., Usher S., Kosik O., Halford N.G. (2021) Wheat with greatly reduced accumulation of free asparagine in the grain, produced by CRISPR/Cas9 editing of asparagine synthetase gene *TaASN2*. *Plant Biotechnol. J.* **19**, 1602–1613. <https://doi.org/10.1111/pbi.13573>
67. Hahn F., Sanjurjo Loures L., Sparks C.A., Kanyuka K., Nekrasov V. (2021) Efficient CRISPR/Cas-mediated targeted mutagenesis in spring and winter wheat varieties. *Plants* (Basel). **10**, 1481. <https://doi.org/10.3390/plants10071481>
68. Liu Y., Luo W., Linghu Q., Abe F., Hisano H., Sato K., Kamiya Y., Kawaura K., Onishi K., Endo M., Toki S., Hamada H., Nagira Y., Taoka N., Imai R. (2021) *In planta* genome editing in commercial wheat varieties. *Front. Plant Sci.* **12**, 648841. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.648841>
69. Krenek P., Chubar E., Vadovic P., Ohnoutkova L., Vlcko T., Bergougnoux V., Capal P., Ovecka M., Samaj J. (2021) CRISPR/Cas9-induced loss-of-function mutation in the barley *Mitogen-Activated Protein Kinase 6* gene causes abnormal embryo development leading to severely reduced grain germination and seedling shootless phenotype. *Front. Plant Sci.* **12**, 670302. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.670302>
70. Kim D., Hager M., Brant E., Budak H. (2021) Efficient genome editing in wheat using Cas9 and Cpf1 (AsCpf1 and LbCpf1) nucleases. *Funct. Integr. Genomics.* **21**, 355–366. <https://doi.org/10.1007/s10142-021-00782-z>
71. Hayta S., Smedley M.A., Clarke M., Forner M., Harwood W.A. (2021) An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for hexaploid and tetraploid wheat. *Curr. Protoc.* **1**, e58. <https://doi.org/10.1002/cpz1.58>
72. Кулуев Б.Р., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Герашенков Г.А., Рожнова Н.А., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матнязов Р.Т., Баймиев А.Х., Баймиев А.Х., Чемерис А.В. (2019) Доставка CRISPR/Cas-компонентов в клетки высших растений для редактирования их геномов. *Физиол. растений.* **66**, 339–353. <https://doi.org/10.1134/S102144371905011X>
73. Ellison E.E., Chamness J.C., Voytas D.F. (2021) Viruses as vectors for the delivery of gene-editing reagents. *Genome Editing Precision Crop Breed.* **97–122**. <https://doi.org/10.1201/9781003048237>
74. Liang Z., Chen K., Li T., Zhang Y., Wang Y., Zhao Q., Liu J., Zhang H., Liu C., Ran Y., Gao C. (2017) Efficient DNAfree genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complex. *Nat. Commun.* **8**, e14261. <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>
75. Liang Z., Chen K., Zhang Y., Liu J., Yin K., Qiu J.L., Gao C. (2018) Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 *in vitro* transcripts or ribonucleoproteins. *Nat. Protoc.* **13**, 413–430. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.145>
76. Ravi M., Chan S.W. (2010) Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature.* **464**, 615–618. <https://doi.org/10.1038/nature08842>
77. Kelliher T., Starr D., Richbourg L., Chintamanani S., Delzer B., Nuccio L.M., Green J., Chen Z., McCuis-ton J., Wang W., Liebler T., Bullock P., Martin B. (2017) MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. *Nature.* **543**, 105–109. <https://doi.org/10.1038/nature20827>
78. Yao L., Zhang Y., Liu C., Liu Y., Wang Y., Liang D., Liu J., Sahoo G., Kelliher T. (2018) OsMATL mutation induces haploid seed formation in indica rice. *Nat. Plants.* **4**, 530–533. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0193-y>
79. Laurie D.A., Bennett M.D. (1988) The production of haploid wheat plants from wheat maize crosses. *Theor. Appl. Genet.* **76**, 393–397.
80. Kelliher T., Starr D., Su X., Tang G., Chen Z., Carter J., Wittich P.E., Dong S., Green J., Burch E., McCuis-ton J., Gu W., Sun Y., Strebe T., Roberts J., Bate N.J., Que Q. (2019) One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nat. Biotechnol.* **37**, 287–292. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0038-x>
81. Budhagatapalli N., Halbach T., Hiekel S., Büchner H., Müller A.E., Kumlehn J. (2020) Site-directed mutagenesis in bread and durum wheat via pollination by cas9/guide RNA-transgenic maize used as haploidy inducer. *Plant Biotechnol. J.* **18**, 2376–2378. <https://doi.org/10.1111/pbi.13415>
82. Han Y., Broughton S., Liu L., Zhang X.Q., Zeng J., He X., Li C. (2020) Highly efficient and genotype-independent barley gene editing based on anther culture. *Plant Commun.* **2**, 100082. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2020.100082>
83. Kapusi E., Stoger E. (2018) Detection of CRISPR/Cas9-induced genomic fragment deletions in barley and generation of homozygous edited lines via embryogenic pollen culture. *Methods Mol. Biol.* **1789**, 9–20. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7856-4_2
84. Li S., Lin D., Zhang Y., Deng M., Chen Y., Lv B., Li B., Lei Y., Wang Y., Zhao L., Liang Y., Liu J., Chen K., Liu Z., Xiao J., Qiu J.L., Gao C. (2022) Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature.* **602**, 455–460. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04395-9>
85. Kis A., Hamar E., Tholt G., Ban R., Havelda Z. (2019) Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol. J.* **17**, 1004–1006. <https://doi.org/10.1111/pbi.13077>
86. Kim S.Y., Bengtsson T., Olsson N., Hot V., Zhu L.H., Ahman I. (2020) Mutations in two aphid-regulated β -1,3-glucanase genes by CRISPR/Cas9 do not increase barley resistance to *Rhopalosiphum padi* L. *Front Plant Sci.* **11**, 1043. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01043>
87. Debernardi J.M., Tricoli D.M., Ercoli M.F., Hayta S., Ronald P., Palatnik J.F., Dubcovsky J. (2020) A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration effi-

- ciency of transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1274–1279.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0703-0>
88. Karunarathne S.D., Han Y., Zhang X.Q., Li C. (2022) CRISPR/Cas9 gene editing and natural variation analysis demonstrate the potential for *HvARE1* in improvement of nitrogen use efficiency in barley. *J. Integr. Plant Biol.* **64**, 756–770.
<https://doi.org/10.1111/jipb.13214>
 89. Vlcko T., Ohnoutkova L. (2020) Allelic variants of CRISPR/Cas9 induced mutation in an inositol triphosphate 5/6 kinase gene manifest different phenotypes in barley. *Plants* (Basel). **9**, 195.
<https://doi.org/10.3390/plants9020195>
 90. Garcia-Gimenez G., Barakate A., Smith P., Stephens J., Khor S.F., Doblin M.S., Hao P., Bacic A., Fincher G.B., Burton R.A., Waugh R., Tucker M.R., Houston K. (2020) Targeted mutation of barley (1,3;1,4)- β -glucan synthases reveals complex relationships between the storage and cell wall polysaccharide content. *Plant J.* **104**, 1009–1022.
<https://doi.org/10.1111/tpj.14977>
 91. Yang Q., Zhong X., Li Q., Lan J., Tang H., Qi P., Ma J., Wang J., Chen G., Pu Z., Li W., Lan X., Deng M., Harwood W., Li Z., Wei Y., Zheng Y., Jiang Q. (2020) Mutation of the D-hordein gene by RNA-guided Cas9 targeted editing reducing the grain size and changing grain compositions in barley. *Food Chem.* **311**, 125892.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125892>
 92. Gerasimova S.V., Hertig C., Korotkova A.M., Kolosovskaya E.V., Otto I., Hiekel S., Kochetov A.V., Khlestkina E.K., Kumlehn J. (2020) Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the *NUD* gene. *BMC Plant Biol.* **20**, 255.
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02454-9>
 93. Gao Y., Zhao Y. (2014) Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing. *J. Integr. Plant Biol.* **56**, 343–349.
<https://doi.org/10.1111/jipb.12152>
 94. Gasparis S., Kała M., Przyborowski M., Łyżniak L.A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. (2018) A simple and efficient CRISPR/Cas9 platform for induction of single and multiple, heritable mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Methods.* **14**, 111.
<https://doi.org/10.1186/s13007-018-0382-8>
 95. Gasparis S., Przyborowski M., Kała M., Nadolska-Orczyk A. (2019) Knockout of the *HvCKX1* or *HvCKX3* gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) by RNA-guided Cas9 nuclease affects the regulation of cytokinin metabolism and root morphology. *Cells.* **8**, 782.
<https://doi.org/10.3390/cells8080782>
 96. Singh M., Kumar M., Albertsen M.C., Young J.K., Cigan A.M. (2018) Concurrent modifications in the three homeologs of *Ms45* gene with CRISPR-Cas9 lead to rapid generation of male sterile bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol.* **97**, 371–383.
<https://doi.org/10.1007/s11103-018-0749-2>
 97. Zheng M., Lin J., Liu X., Chu W., Li J., Gao Y., An K., Song W., Xin M., Yao Y., Peng H., Ni Z., Sun Q., Hu Z. (2021) Histone acetyltransferase TaHAG1 acts as a crucial regulator to strengthen salt tolerance of hexaploid wheat. *Plant Physiology.* **186**, 1951–1969,
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab187>
 98. Tian X., Qin Z., Zhao Y., Wen J., Lan T., Zhang L., Wang F., Qin D., Yu K., Zhao A., Hu Z., Yao Y., Ni Z., Sun Q., De Smet I., Peng H., Xin M. (2022) Stress granule-associated *TaMBF1c* confers thermo-tolerance through regulating specific mRNA translation in wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol.* **233**, 1719–1731.
<https://doi.org/10.1111/nph.17865>
 99. Chen Z., Ke W., He F., Chai L., Cheng X., Xu H., Wang X., Du D., Zhao Y., Chen X., Xing J., Xin M., Guo W., Hu Z., Su Z., Liu J., Peng H., Yao Y., Sun Q., Ni Z. (2022) A single nucleotide deletion in the third exon of *FT-D1* increases the spikelet number and delays heading date in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol. J.*
<https://doi.org/10.1111/pbi.13773>
 100. Wang P., Li G., Li G., Yuan S., Wang C., Xie Y., Guo T., Kang G., Wang D. (2021) TaPHT1;9-4B and its transcriptional regulator TaMYB4-7D contribute to phosphate uptake and plant growth in bread wheat. *New Phytol.* **231**, 1968–1983.
<https://doi.org/10.1111/nph.17534>
 101. Miroshnichenko D., Ashin D., Pushin A., Dolgov S. (2018) Genetic transformation of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum* L.), a diploid cultivated wheat species. *BMC Biotechnol.* **18**(1), 68.
<https://doi.org/10.1186/s12896-018-0477-3>
 102. Miroshnichenko D., Klementyeva A., Pushin A., Dolgov S. (2020) A competence of embryo-derived tissues of tetraploid cultivated wheat species *Triticum dicoccum* and *Triticum timopheevii* for efficient and stable transgenesis mediated by particle inflow gun. *BMC Plant Biol.* **20**(Suppl. 1), 442.
<https://doi.org/10.1186/s12870-020-02580-4>
 103. Wang K., Shi L., Liang X., Zhao P., Wang W., Liu J., Chang Y., Hiei Y., Yanagihara C., Du L., Ishida Y., Ye X. (2022) The gene *TaWOX5* overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation. *Nat. Plants.* **8**, 110–117.
<https://doi.org/10.1038/s41477-021-01085-8>
 104. Gerasimova S.V., Korotkova A.M., Hertig C., Hiekel S., Hoffie R., Budhagatapalli N., Otto I., Hensel G., Shumny V.K., Kochetov A.V., Kumlehn J., Khlestkina E.K. (2018) Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable siberian barley cultivar using RNA-guided CAS9 endonuclease. *Vavilov J. Genet. Breed.* **22**(8), 1033–1039.
<https://doi.org/10.18699/VJ18.447>
 105. Тимербаев В.Р., Мирошниченко Д.Н., Клементьева А.А., Шульга О.А., Салина Е.А., Долгов С.В. (2021) Молекула РНК-проводника для геномного редактирования протомоторной области гена *VRN-A1* однодольных зерновых с применением системы CRISPR/Cas9. Патент на изобретение 2762831 С1, 23.12.2021. Заявка №2020134985 от 26.10.2020.

Genome Editing of Representatives of the Triticeae Tribe Using the CRISPR/Cas System

B. R. Kuluev^{1, 2 *}, E. V. Mikhailova^{1, 2}, A. R. Kuluev¹, A. A. Galimova^{1, 2},
E. A. Zaikina¹, and E. K. Khlestkina²

¹*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

²*Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Saint Petersburg, 190000 Russia*

*e-mail: kuluev@bk.ru

The tribe Triticeae includes such important agricultural crops as bread wheat, durum wheat, barley, rye and triticale. Research in the field of reverse genetics and genetic engineering of the Triticeae received a new impetus after the active use of the CRISPR/Cas genome editing system. This review collects and analyzes data on recent successes in genomic editing of cultivated plants of the Triticeae tribe and the tools used. The most commonly used arsenal for genome editing of Triticeae includes the codon-optimized *Cas9* gene under the control of the maize ubiquitin gene promoter and guide RNAs under the control of Pol III promoters U6 and U3 in one or more binary vectors. The genes for resistance to phosphinothricin and hygromycin are used as selective genes. To obtain edited plants, the methods of agrobacterium-mediated transformation and biolistics are used, while immature embryos are used as explants. Approaches are being developed to overcome the problem of low regenerative capacity of representatives of the Triticeae tribe: *in planta* transformation of shoot apical meristems, transformation of microspores and pollen grains, and the use of haploinductors. Much of the work published to date has been devoted to the genomic editing of bread wheat and barley, although recent years have seen the emergence of CRISPR/Cas knockout studies of target genes in durum wheat and triticale. Further progress in the development of genome editing of cultivated plants of the Triticeae tribe should be aimed at expanding the range of species and varieties involved, as well as overcoming the problems of low regenerative capacity, which will allow genetic modification work to be carried out in elite varieties that will be in demand in agricultural production.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Triticum durum*, ×*Triticosecale*, bread wheat, barley, promoters, selectable gene, agrobacterium-mediated transformation, immature embryos, microspores, haploinductors

УДК 577.15;577.21

**цис-ПРЕНИЛТРАНСФЕРАЗЫ *Marchantia polymorpha*:
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ПЕРСПЕКТИВЫ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА
АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

© 2022 г. Л. Р. Валеева^{а, *}, С. М. Джабраилова^а, М. Р. Шарипова^а

^аИнститут фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: liarvaleeva@gmail.com

Поступила в редакцию 29.03.2022 г.

После доработки 10.06.2022 г.

Принята к публикации 16.06.2022 г.

Синтез вторичных метаболитов играет одну из центральных ролей в выживании растений и их устойчивости к биотическому и абиотическому стрессу. Менее изученными, как с фундаментальной, так и с практической точки зрения, остаются растительные полиизопренолы, хотя их широкое распространение в растениях указывает на важную роль в клеточном метаболизме. Полиизопренолы растений синтезируются цис-пренилтрансферазами (CPTs), поэтому изучение этих ферментов необходимо для понимания путей синтеза, локализации и функций полиизопренолов растений. К уникальной группе растений, обладающей большим потенциалом для проведения исследований CPTs, относятся бриофиты, в том числе печеночный мох *Marchantia polymorpha*. Нами проведен биоинформатический анализ генов CPTs в геноме бриофита *M. polymorpha* и идентифицировано семь, гомологичных генам *AtCPT7* и *AtCPT3 Arabidopsis thaliana*, участвующим в синтезе полиизопренолов. Получены четыре индивидуальные линии растений-мутантов *M. polymorpha* по гену *MpCPT7.37*. Показано, что в трех линиях мутация приводила к сдвигу рамки считывания и нокауту этого гена. Однако нокаут только одной из CPTs типа 7 не оказывал влияния на рост и выживаемость растений. Выявлено, что антибактериальная активность экстрактов тканей растений-мутантов значимо не отличалась от растений дикого типа, что указывает на возможный компенсаторный эффект, обусловленный активностью других CPTs типа 7. Полученные данные предваряют дальнейшие исследования CPTs бриофитов и продуктов их синтеза.

Ключевые слова: цис-пренилтрансферазы, полиизопренолы, бриофиты, *Marchantia polymorpha*, вторичные метаболиты, антибактериальная активность, CRISPR/Cas9

DOI: 10.31857/S0026898422060234

В ходе эволюции растения выработали множество стратегий адаптации к абиотическим и биотическим стрессам путем изменений в регуляции и формировании новых метаболических путей, включая синтез большого разнообразия вторичных метаболитов [1, 2]. Несмотря на разнообразие, для большинства вторичных метаболитов растений характерны карбоновые структуры, составляющие основу новых химических соединений, претерпевающие модификацию путем гликозилирования, ацилирования, метилирования и др. [2]. Один из типов модификаций метаболитов — пренилирование, играющее значимую роль в формировании метаболома. Процесс пренилирования метаболитов заключается в присоединении

изопреноидного остатка к акцепторной молекуле, в качестве которой могут выступать ароматические соединения и сами изопреноиды. К последним относятся такие соединения, как стероидные гормоны, каротиноиды, ароматические метаболиты, убихиноны с изопреноидными боковыми цепями и др. [3]. Также пренилирование играет основную роль в дифференциации ароматических соединений растений, таких как фенилпропаноиды, флавоноиды и кумарины. Кроме того, зачастую пренилированные метаболиты обладают более выраженной противоопухолевой и антимикробной активностью по сравнению с их непренилированными предшественниками. Это объясняет растущий интерес к их изучению как потенциально новых препаратов для медицины и промышленности [4–6]. Однако, в отличие от пренилированных ароматических соединений

Сокращения: CPTs (*cis*-prenyltransferases) — цис-пренилтрансферазы.

растений, практически не изученной, как с фундаментальной, так и практической точки зрения, остается другая группа вторичных метаболитов, обладающих изопреноидной структурой, – полиизопренолы.

Полиизопренолы представляют собой длинноцепочечные молекулы, состоящие из изопреновых остатков, синтезируемые в клетках организмов различных таксонов. Большинство организмов способно синтезировать два типа таких соединений: ненасыщенные полиизопренолы (полипренолы) и насыщенные полиизопренолы (долихолы). Их соотношение в клетках варьирует у разных видов, а их локализация отличается тканеспецифичностью [7, 8]. Многие растения также содержат большое разнообразие коротко- и среднецепочечных полипренолов (С10–С40 и С40–С65), а также долихолы, в состав которых у растений входит от 70 до 100 атомов углерода. В то время как длинноцепочечные долихолы и их полипреноловые предшественники находят в различных тканях растений, молекулы С40–С65 в основном обнаруживают в пластидах, а короткоцепочечные – в основном в клетках корней, а также в трихомах, черешках и тканях листьев [9].

Функции растительных полипренолов малоизучены, однако их широкое распространение в клетках и тканях всех растений предполагает важную роль в жизненном цикле последних [7, 8]. Изменения в метаболизме полиизопренолов происходят в процессе развития клеток и тканей, а также под влиянием различных внешних факторов и стрессовых стимулов [8]. Долихолы, аккумулированные в мембранах клеток эндоплазматического ретикулума (ЭПР) растений, как и большинства эукариот, участвуют в регуляции *N*-гликозилирования белков и последующем направлении белковых молекул по секреторному пути [9]. Тем самым изучение полиизопренолов имеет важное значение для понимания их участия в функционировании организма в целом.

Кроме того, изучение полиизопренолов имеет практическое значение, так как их рассматривают в качестве потенциальных биологически активных соединений, в частности антимикробных агентов. Так, показано, что полипренолы из тканей растений гинкго (*Ginkgo biloba* L.) и шелковицы (*Morus alba* L.) обладают антибактериальным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных патогенных бактерий [10].

Основные ферменты, участвующие в метаболическом пути синтеза полиизопренолов растений, – *цис*-пренилтрансферазы (СРТs), присоединяющие изопреноидные остатки по типу “голова к хвосту” [3]. Для растений характерно наличие множества СРТs, классифицированных в семейства, однако в связи с недостаточной изученностью только для некоторых из них подтвер-

ждено участие в синтезе полиизопренолов [11]. Субстратом для синтеза полиизопренолов служат С10-, С15- и С20-углеродные предшественники: геранилдифосфат, фарнезилдифосфат и геранилгеранилдифосфат соответственно [12]. Однако данных о растительных СРТs недостаточно; причем большая часть исследований ограничивается экспериментами на модельном растении *Arabidopsis thaliana*. Более глубокое изучение СРТs с использованием широкого ряда модельных и немодельных растительных организмов позволит получить новые данные для понимания путей синтеза, локализации и функциональной роли полипренолов растений. Такими перспективными модельными растениями считаются бриофиты.

Бриофиты (зеленые и антоцеротовые мхи, печеночники) представляют группу наземных растений, обладающих огромным потенциалом для проведения исследований в области эволюции, генетики, молекулярной биологии и физиологии растений [13]. Кроме того, бриофиты продуцируют широкий спектр уникальных для наземных растений метаболитов, что позволяет их считать ценными объектами в изучении метаболизма растений [14–16]. Представитель бриофитов – печеночник *Marchantia polymorpha* – известен как источник множества соединений, обладающих антимикробной, ранозаживляющей, противоопухолевой, антиоксидантной и многими другими типами активностей. Простота культивирования и небольшие размеры бриофитов сделали их удобными объектами для фундаментальных исследований и перспективными продуцентами для промышленности.

Нами проведен биоинформатический поиск и филогенетический анализ последовательностей генов СРТs *M. polymorpha*. Обнаружено шесть генов СРТs типа 7 и один ген СРТs типа 3, тогда как в геноме растений *A. thaliana* идентифицировано 9 типов СРТs. Для выявления функциональной роли отдельных генов-гомологов СРТs в развитии растений *M. polymorpha* провели нокаут одного из обнаруженных генов – *MpCPT7.37* (Mapoly0142s0037) – и оценили фенотип нокаутированного растения. Показано, что нокаут только одного гена не отражается на жизнеспособности растения, а также на антимикробном потенциале внутриклеточных метаболитов *M. polymorpha*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформатический поиск и анализ последовательностей генов СРТs. Биоинформатический поиск последовательностей генов СРТs в геноме растений *M. polymorpha* проводили с использованием баз данных открытого доступа: marchantia.info, www.phytozome.net, <http://arabidopsis.org/>. Множественное выравнивание белковых последовательностей СРТs *A. thaliana* и *M. polymorpha* проводи-

ли с использованием программного обеспечения MUSCLE на платформе <http://www.phylogeny.fr/>. Для построения дендрограмм использовали программное обеспечение PhyML на платформе <http://www.phylogeny.fr/>.

Культивирование мхов. Асептические культуры мхов *M. polymorpha* линии Takaragaike-1 (мужское растение) и Takaragaike-2 (женское растение) выращивали на твердой питательной среде 50% Gamborg's B5 (GB5) без добавления витаминов. Состав среды, г/л: KNO₃ – 2.5, CaCl₂·2H₂O – 0.15, MgSO₄·7H₂O – 0.25, (NH₄)₂SO₄ – 0.134, NaH₂PO₄·H₂O – 0.15, H₃BO₃ – 0.003, MnSO₄·H₂O – 0.01, ZnSO₄·7H₂O – 0.002, Ferric-EDTA – 0.043, KI – 0.75 × 10⁻³, Na₂MoO₄·2H₂O – 0.25 × 10⁻³, CuSO₄·5H₂O – 0.025 × 10⁻³, CoCl₂·6H₂O – 0.025 × 10⁻³, pH 5.5. Условия роста растений: режим освещения – 16 ч/8 ч день/ночь, температура 22°C/20°C, влажность 65%.

Культивирование бактерий. В работе использовали штаммы бактерий *Escherichia coli* DH5α, *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25293. Бактерии растили на жидкой или агаризованной питательных средах LB (Lysis broth), г/л: триптон – 10, хлорид натрия – 5, дрожжевой экстракт – 5. Агаризованная среда содержала 2% бактериального агара. Для культивирования *A. tumefaciens* GV2260 в среду добавляли антибиотик карбенициллин (100 мкг/мл), необходимый для стабильной репликации плазмиды-помощника, несущей *vir*-гены (*vir*-helper plasmid). Штамм *E. coli* DH5α культивировали при температуре 37°C, *A. tumefaciens* GV2260 – при 28°C, *S. aureus* ATCC 25293 – при 35°C.

Создание гетерологичных векторных конструкций для редактирования генома *M. polymorpha*. Для нокаутирования гена CPT *M. polymorpha* использовали технологию CRISPR/Cas9 для редактирования генома. Для создания конструкции CRISPR/Cas9 в программе CRISPR 2.0 подбирали последовательность одиночной направляющей РНК (sgРНК), соответствующую целевому геномному участку, в который необходимо внести мутацию. Кодированную sgРНК последовательность синтезировали с добавлением сайтов рестрикции эндонуклеазы BsaI. Полученные олигонуклеотидные последовательности нагревали до 100°C и оставляли при

комнатной температуре для получения двухцепочечной ДНК (дцДНК) с сайтами рестрикции по типу “липких концов”; проводили ее клонирование в вектор pMrGE_En03 [17, 18] по сайту рестрикции BsaI путем лигирования с использованием T4-лигазы. Далее проводили трансформацию химически компетентных клеток *E. coli* DH5α полученной плазмидой по стандартному протоколу. Результаты клонирования подтверждали генотипированием и секвенированием с использованием специфических праймеров (табл. 1).

Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) по протоколу производителя. Далее проводили субклонирование области, содержащей последовательность sgРНК и промотора, в бинарный вектор pMrGE011 (бинарный вектор для агробактериальной трансформации *M. polymorpha*, содержащий маркерный ген устойчивости к хлорсульфону (*mALS*) [17, 18]) по методу Gateway с использованием смеси ферментов Clonase II и протокола производителя (“Invitrogen”, США). Результаты клонирования подтверждали генотипированием и секвенированием.

Бинарные векторы, содержащие вставки sgРНК, трансформировали в клетки *A. tumefaciens* GV2260 [19]. Результаты трансформации агробактерий подтверждали генотипированием.

Химически компетентные клетки *A. tumefaciens* готовили по протоколу Höfgen & Willmitzer [19] с модификациями. Ночную культуру *A. tumefaciens* GV2260 (1 мл) инокулировали в 200 мл среды LB и инкубировали при 28°C до достижения оптической плотности 0.5–0.8 при длине волны 595 нм (OD₅₉₅). Культуру охлаждали на льду в течение 10 мин и осаждали клетки центрифугированием при 5600 g в течение 10 мин при температуре 4°C. Осадок клеток ресуспензировали в 20 мл ТЕ-буфера (10 мМ Tris, 1 мМ ЭДТА, pH 8.0) и центрифугировали в условиях, указанных выше. Осадок ресуспензировали в 20 мл ТЕ-буфера, содержащего 15% глицерина. Аликвоты бактериальной суспензии (300 мкл) переносили в микропробирки, замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

| Название праймера | Последовательность, 5' → 3' | Назначение |
|-------------------|-----------------------------|---|
| CPT37_1g_Fwd | CTCGGTGGTGGACAGATGTGTG | Синтез sgРНК |
| CPT37_1g_Rev | AAACCACACATCTGTCCACCAC | |
| CPT37_gt_F | TACTATCTGGTGGCTGAAATGTC | Генотипирование/получение ампликонов для секвенирования и выявления мутаций у растений-трансформантов |
| CPT_gt_R | CTGGCTCATATCTGCACAAC | |
| M13-Rev | CAGGAAACAGCTATGAC | Генотипирование векторных конструкций |

Трансформация растений *M. polymorpha*. Т-ДНК интегрировали в геном растений *M. polymorpha* по методу агробактериальной трансформации талломов с модификациями [20]. Выводковые почки маршанции помещали в чашки Петри на среду GB5 и растили в течение двух недель в стандартных условиях. Выросшие талломы разрезали на 4 фрагмента с отсечением апикальных частей и переносили базальные фрагменты на среду GB5 с добавлением 1% сахарозы. Растения инкубировали в течение двух суток при стандартных условиях, после чего фрагменты переносили в колбы со 100 мл среды для трансформации M51C [21], в которую добавляли ацетосирингон до конечной концентрации 100 мкМ и затем культуру агробактерий (OD_{595} 0.9–1.0). Коинкубацию проводили при перемешивании в стандартных для растений условиях роста (режим освещения – 16 ч/8 ч день/ночь, температура – 22°C/20°C, влажность – 65%) в течение четырех суток, после чего талломы растений отмывали от агробактериальных культур, используя для этого стерильную дистиллированную воду (пятикратная отмывка). Селекцию трансформантов проводили в чашках Петри на среде 50% GB5 с добавлением хлорсульфуона (0.5 мкМ) в течение 20 суток. Дополнительно в среду добавляли антибиотик цефотаксим (100 мкг/мл) для подавления роста агробактерий. Прошедшие селекцию ткани растений-трансформантов переносили в отдельные чашки Петри с селективной средой и проводили генотипирование и секвенирование фрагментов, соответствующих целевому участку генома.

Выделение ДНК растений. ДНК из тканей растений-трансформантов для проведения генотипирования и секвенирования выделяли по стандартному протоколу с использованием СТАВ-буфера [22] с небольшой модификацией: для отделения водной ДНК-содержащей фракции вместо смеси фенол–хлороформ–изоамиловый спирт использовался 100%-ный хлороформ.

Выделение растительных экстрактов. Экстракцию метаболитов из тканей *M. polymorpha* проводили методом мацерации тканей с использованием метанола в качестве растворителя. Ткани растений собирали с поверхности среды, взвешивали и гомогенизировали путем замораживания и растирания в жидком азоте. Полученный мелкодисперсный порошок помещали в растворитель (80%-ный метанол) в соотношении 0.9–1.2 г ткани : 10 мл растворителя. Мацерацию проводили на шейкере при скорости вращения 130 об/мин в течение 24 ч при комнатной температуре, исключая попадание прямых лучей света на образец. Полученную суспензию центрифугировали при 11 200 g в течение 20 мин при 4°C и пропускали через фильтр с размером пор 0.45 мкм. Полученные экстракты высушивали в вакуумном центрифужном кон-

центраторе Concentrator Plus (“Eppendorf”, Германия) при комнатной температуре и взвешивали.

Непосредственно перед проведением анализа антибактериальной активности высушенные образцы растворяли в метаноле в конечной концентрации 100 мкг/мкл. Растворенные экстракты (50 мкл/диск) наносили на стерильные целлюлозные диски (диаметр 5 мм). Диски высушивали в ламинаре при комнатной температуре и хранили в условиях, предотвращающих попадание прямых лучей света.

Анализ антибактериальной активности с использованием диско-диффузионного метода. Ингибирование роста бактерий экстрактами тканей *M. polymorpha* анализировали с помощью диско-диффузионного метода в соответствии с CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; www.clsi.org). Бактериальную тест-культуру, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, вносили в 5 мл 0.7%-ного LB-агара в концентрации 1×10^7 КОЕ/мл и распределяли по поверхности 2%-ного LB-агара в чашках Петри. На поверхность агара помещали стерильные целлюлозные диски с растительными экстрактами (см. выше) и наносили на каждый диск по 10 мкл DMSO – для растворения метаболитов. Чашки Петри инкубировали в термостате в течение 18 ч, после чего измеряли диаметр зоны ингибирования роста бактериальной тест-культуры. В качестве контроля использовали диски с нанесенным на них 80%-ным метанолом и 10 мкл DMSO. Для каждой линии растений эксперимент проводили в трех повторях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поиск и анализ последовательностей цис-пренилтрансфераз M. polymorpha

Провели биоинформатический анализ генома *M. polymorpha* с целью обнаружения генов, кодирующих СРТs, с использованием баз данных Arabidopsis.org, marchantia.info и Phytozome. В качестве референсных генов-гомологов использовали последовательности девяти генов СРТs *A. thaliana*, *AtCPT1–AtCPT9* (рис. 1a, база данных Arabidopsis.org; <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=135289&type=locus>), участвующих в синтезе полиизопренолов [8].

Обнаружено, что в геноме *M. polymorpha* содержится семь генов СРТs; причем шесть из них идентифицированы в базе данных Phytozome и marchantia.info как гены СРТs типа 7 (*MpCPT7*), тогда как один ген – как ген СРТ типа 3 (*MpCPT3*). Провели выравнивание аминокислотных последовательностей обнаруженных СРТs *M. polymorpha* и СРТs *A. thaliana*. Для белка *MpCPT7.16* выявлена гомология в 49.4% с *AtCPT7*. Невысокая гомология с СРТ типа 7 из *A. thaliana*, *AtCPT7*, также обнаружена для трех из шести *MpCPTs*:

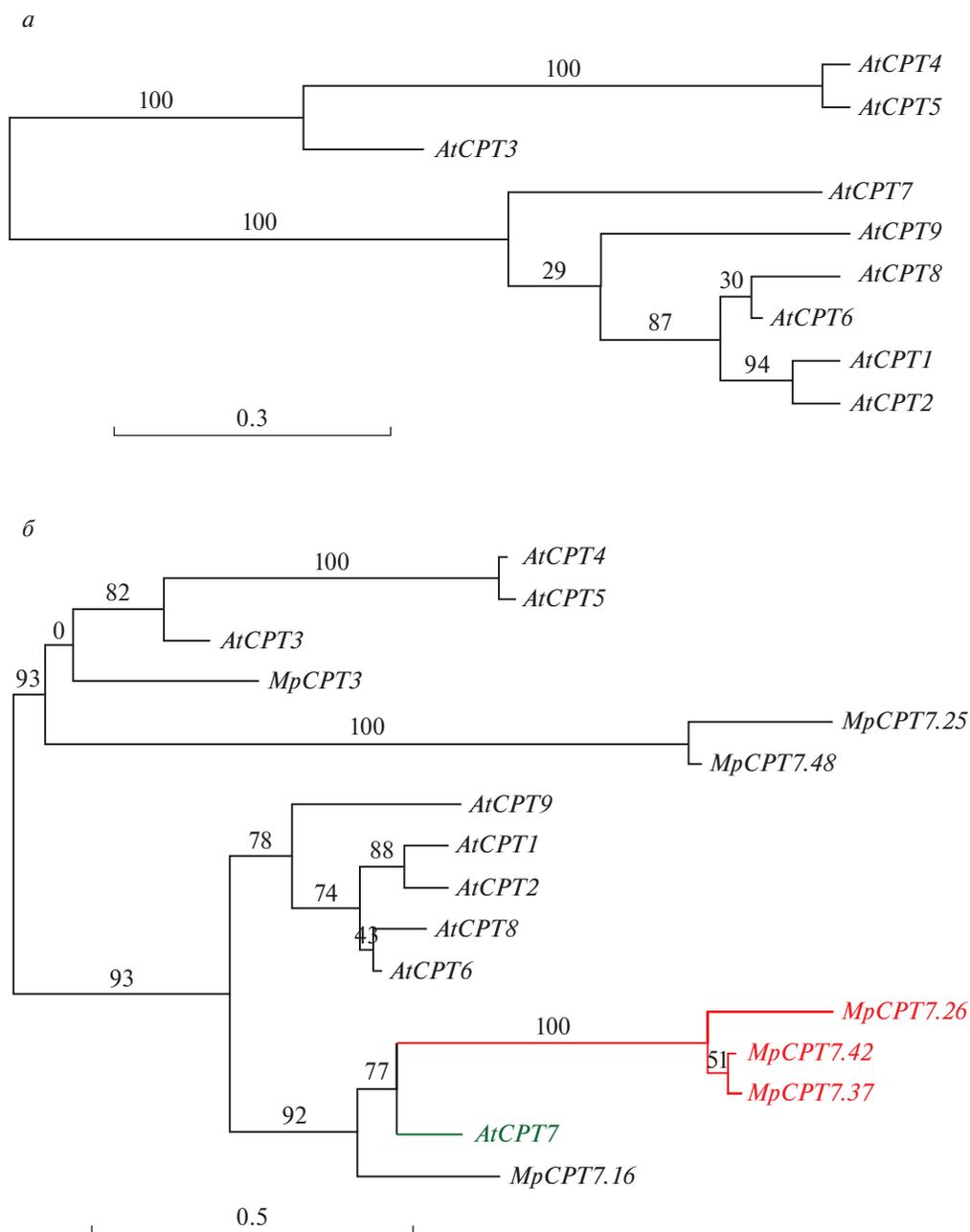


Рис. 1. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей цис-пренилтрансфераз растений. *a* – Дендрограмма цис-пренилтрансфераз растения *Arabidopsis thaliana* (AtCPT). *б* – Дендрограмма цис-пренилтрансфераз растений *Arabidopsis thaliana* и *Marchantia polymorpha* (MpCPT). Зеленым и красным цветом выделены филогенетически близкие CPTs типа 7 *A. thaliana* и *M. polymorpha*.

MpCPT7.26 (ген *Mapoly0121s0026*) – 39.4%, MpCPT7.37 (ген *Mapoly0142s0037*) – 43.5% и MpCPT7.42 (ген *Mapoly0142s0042*) – 43.4% (<https://marchantia.info/>, аннотации генов даны по версии сборки генома Mp JGI3.1) (рис. 1*a, б*). При построении дендрограммы показано, что в гене, кодирующем MpCPT7, произошла дивергенция, в результате которой образовались две ветви ферментов, одной из которых стал Mp-

CPT7.16. Вторая ветвь включает три фермента: MpCPT7.26, MpCPT7.37 и MpCPT7.42, – наиболее близкие к AtCPT7 (рис. 1*б*). В свою очередь, MpCPT7.25 (ген *Mapoly0087s0025*) и MpCPT7.48 (ген *Mapoly0025s0048*), также аннотированные как MpCPT7, филогенетически близки белкам AtCPT3 (рис. 1*б*).

При выравнивании аминокислотных последовательностей идентифицированных белков CPTs

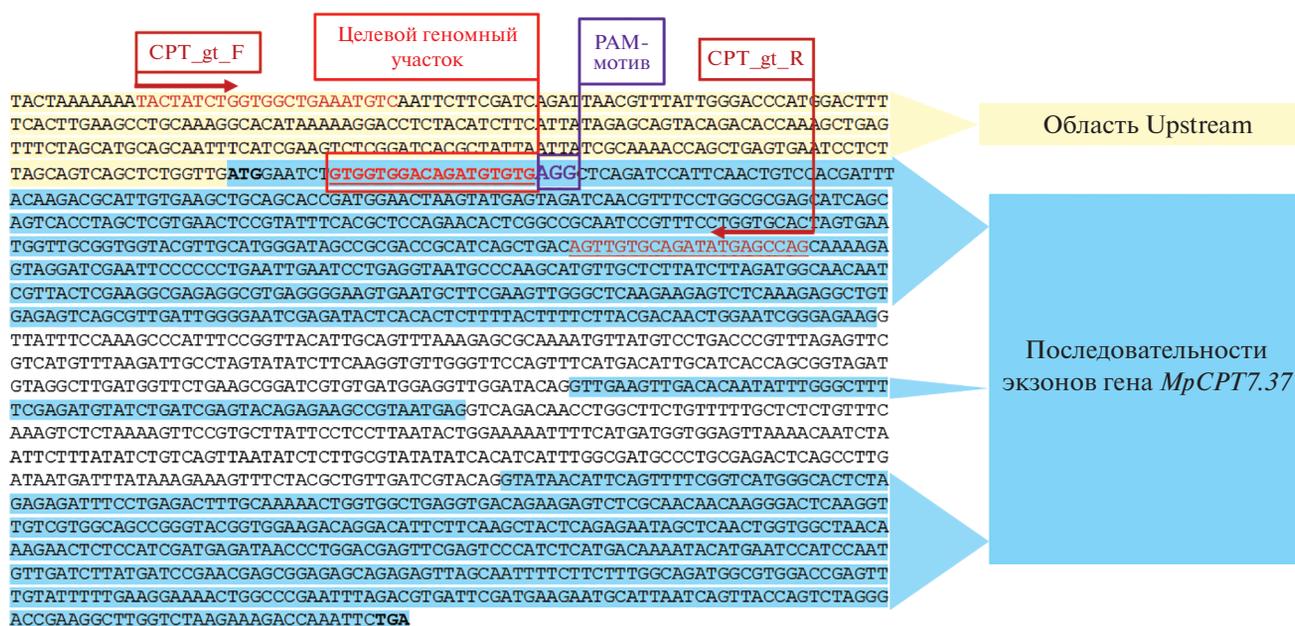


Рис. 2. Последовательность гена *Mapoly0142s0037* (белок МрСРТ7.37) и целевой геномный участок для CRISPR/Cas9-редактирования. CPT_gt_F и CPT_gt_R – праймеры для анализа наличия мутаций в гене *МрСРТ7.37* у растений-трансформантов. Не выделенная цветом область гена – последовательности интронов. ATG и TGA – старт- и стоп-кодоны гена.

нами выявлено шесть консервативных областей, характерных как для пренилтрансфераз *A. thaliana*, так и *M. polymorpha* (рис. S1, см. Дополнительные материалы):

- 1) мотив MP(R/K/T/C)HVA(V/F/I/L)IMDGNRR-(W/Y/F/I)AKxxGL (77–97 а.о.; здесь и далее x – варибельный остаток, нумерация аминокислотных остатков приведена относительно последовательности белка AtCPT7);
- 2) мотив GHxxG (101–106 а.о.);
- 3) мотив GIxxTxFAFSxDNWxRxxxE(V/I/S/L)-xxL(M/F)xLxxxxL (120–153 а.о.);
- 4) мотив RxS(V/I)IGxxxxLP(E/K/D/A)xL (165–180 а.о.);
- 5) мотив YxGxx(D/E/K)(V/I)/(L/V/M/S)xA (204–214 а.о.);
- 6) мотив PDL(M/L/T/V/I)IRTSGEQR(V/L/I)-SNF(F/L/M/A)(L/T)W(Q/E)LAYTELF (250–278 а.о.).

Таким образом, в геноме *M. polymorpha* содержится шесть генов, аннотированных как CPTs типа 7, четыре из которых гомологичны CPT типа 7 *A. thaliana*, а два филогенетически ближе CPT типа 3 *A. thaliana*. Также обнаружен один ген, кодирующий CPT типа 3.

Конструирование вектора для редактирования гена цис-пренилтрансферазы *M. polymorpha*

Для анализа функциональной роли CPTs типа 7 в клетках *M. polymorpha* и их влияния на рост, развитие и формирование метаболома в геноме растения провели нокаутирование одного из обнаруженных генов – *Mapoly0142s0037* (белок МрСРТ7.37). Для этого гена известно два гомолога: *Mapoly0121s0026* (белок МрСРТ7.26), и *Mapoly0142s0042* (белок МрСРТ7.42), – что можно расценивать как потенциальную функциональную дивергенцию.

Нокаутирование гена *Mapoly0142s0037* (далее *МрСРТ7.37*) проводили с использованием системы CRISPR/Cas9 (рис. 2). Бинарную плазмиду, несущую генетическую кассету CRISPR/Cas9 для редактирования гена *МрСРТ7.37*, получали на основе вектора рMrGE011 (рис. 3). Последовательность ДНК, кодирующая sgPHK, была подобрана с использованием программы CRISPR 2.0 в наиболее близком расположении к старт-кодону гена для получения растений-мутантов с поврежденной инициацией транскрипции (табл. 1, рис. 2).

Олигонуклеотидную последовательность, кодирующую sgPHK, клонировали под контроль промотора малой ядерной РНК (snPHK) *M. polymorpha* MrU6-1рго в вектор рMrGE_En03, содержащий в составе специфические последовательности attL1 и attL2 для дальнейшего субклонирования (рис. 3), и проводили трансформацию полученных векторов в клетки *E. coli* DH5α. Нали-

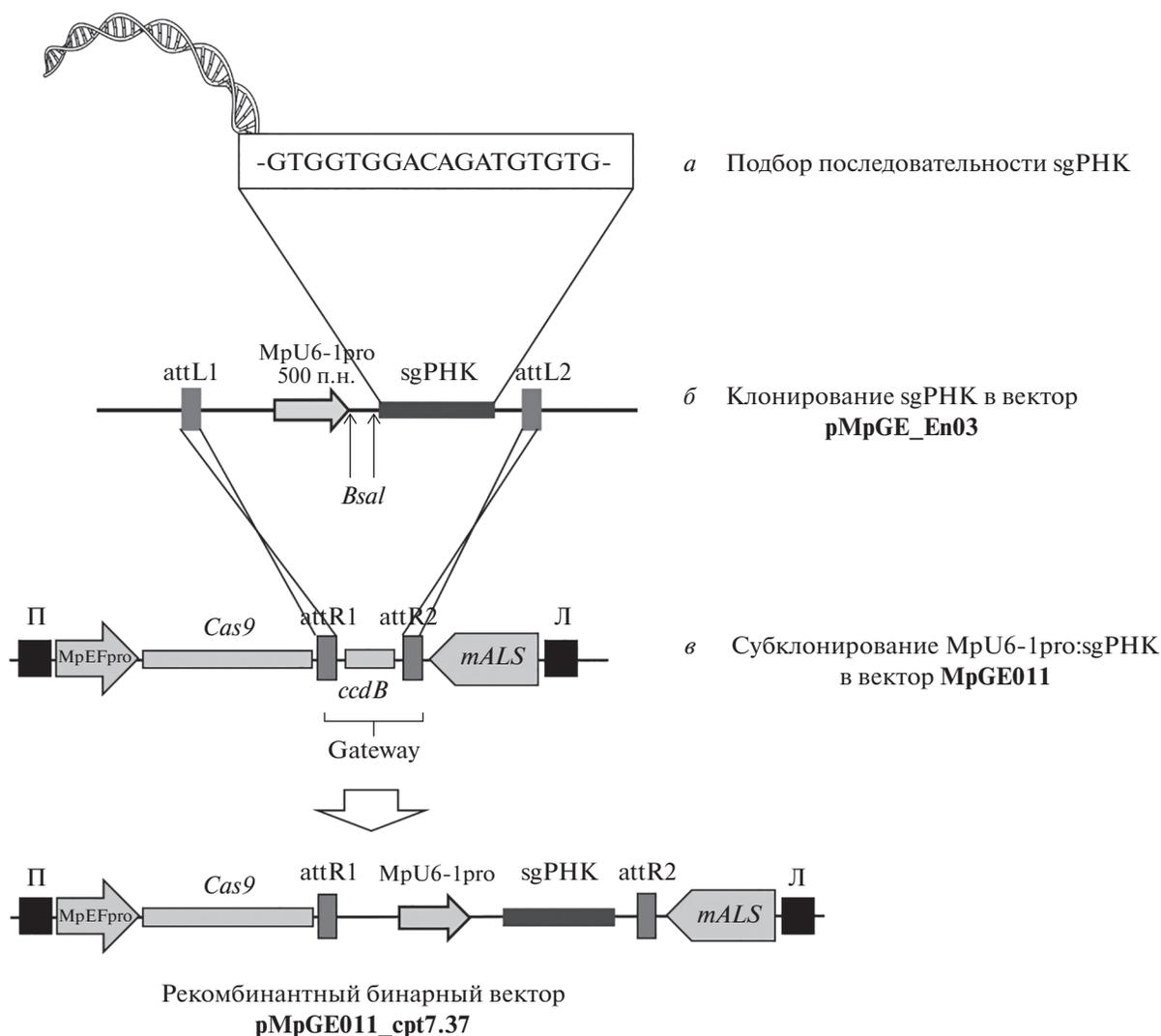


Рис. 3. Схема клонирования и получения рекомбинантного бинарного вектора для трансформации растений *M. polymorpha*. *а* – Последовательность sgPHK к гену *MpCPT7.37*. *б* – Схема вектора pMpGE_En03: MpU6-1pro – промотор малой ядерной РНК *M. polymorpha*; attL1 и attL2 – области для гомологичной рекомбинации; sgPHK – направляющая РНК системы CRISPR/Cas9 для гена *MpCPT7.37*; BsaI – сайт рестрикции. *в* – Схема бинарного вектора pMpGE011: MpEFpro – промотор *M. polymorpha*; П и Л – правая и левая границы области Т-ДНК; Cas9 – ген эндонуклеазы Cas9; attR1, attR2 – области для гомологичной рекомбинации; Gateway – область рекомбинации; MpU6-1pro:sgPHK – последовательность направляющей РНК, комплементарной таргетному участку в нокаутуемом гене, под контролем промотора MpU6-1pro; mALS – ген устойчивости к хлорсульфону. Нижняя часть рисунка модифицирована из работы Sugano S.S. с соавт. [18, лицензия Creative Commons Attribution License].

чие полноразмерной вставки sgPHK-cpt37 в полученных рекомбинантных векторах подтверждено генотипированием и секвенированием (рис. 4).

Далее последовательность MpU6:sgPHK_cpt37 субклонировали в Т-ДНК-область бинарного вектора pMPGE011, содержащей ген устойчивости к хлорсульфону в качестве селективного маркера для растений-трансформантов, и получили бинарный вектор pMpGE011_cpt37 (рис. 3). Наличие полноразмерной вставки подтвердили генотипированием (рис. 5). Бинарный вектор pMpGE011_cpt37 трансформировали в клетки *A. tumefaciens* GV2260 и получили агробактери-

альный штамм для последующей трансформации растений.

Таким образом, нами сконструирована плазмида pMpGE011_cpt37 для получения линий растений-мутантов *M. polymorpha* по гену *MpCPT7.37* и получен штамм *A. tumefaciens* GV2260, несущий данную плазмиду, для проведения трансформации растений.

Получение растений-нокаутов по гену *MpCPT7.37*

Полученный штамм *A. tumefaciens* GV2260, несущий бинарную плазмиду pMGE011_cpt37, ис-

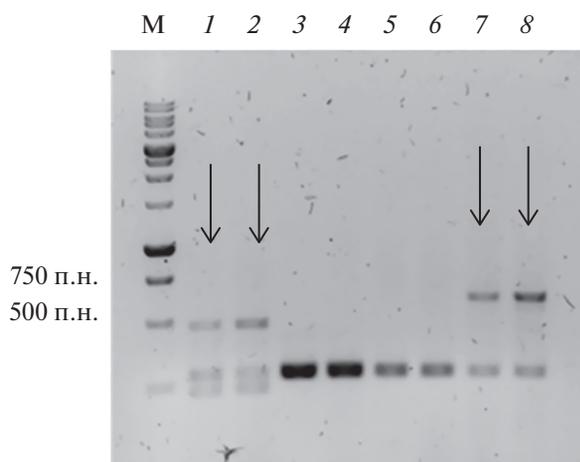


Рис. 4. Генотипирование колоний-трансформантов на наличие плазмиды рМрGE_En03 с интегрированной вставкой sgРНК. Искомый размер ПЦР-продукта – 500 п.н. М – маркер длины ДНК. Стрелками показаны положительные клоны.

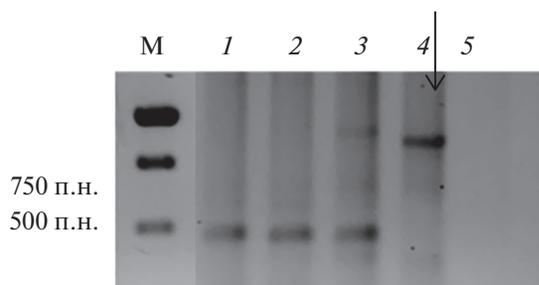


Рис. 5. Генотипирование колоний-трансформантов на наличие плазмиды рМрGE_011 с интегрированной вставкой МрU6-pro::sgРНК. Искомый размер ПЦР-продукта – около 750 п.н. М – маркер длины ДНК. Стрелкой показан положительный клон.

пользовали для проведения трансформации растений *M. polymorpha* Так-1 и получения линий с нокаутированным геном *МрСРТ7.37*. В результате агробактериальной трансформации получено 9 индивидуальных линий растений-трансформантов. Путем секвенирования фрагментов ДНК ампликонов, содержащих последовательность sgРНК, показано наличие мутаций у четырех индивидуаль-

ных растений *M. polymorpha* (см. Дополнительные материалы, рис. S2–S5).

В результате получены линии растений с различными мутациями в последовательности целевого участка гена, которые обусловлены репарацией двунитевых разрывов, вносимых CRISPR/Cas9 системой по механизму негомологичного соединения концов (NHEJ, *non-homologous end joining*) (табл. 2). В целевом гене растения-нокаута № 1 выявлена делеция GA, затрагивающая инициаторный кодон (ATG) мРНК *МрСРТ7.37*: 5'-GTG-GTGGACAgATGTGTGTG-3', – что приводит к сдвигу рамки считывания и, как следствие, к нокауту гена (см. Дополнительные материалы, рис. S2). В линии растений-нокаутов № 2 обнаружена 15-нуклеотидная делеция в гене *МрСРТ7.37*: 5'-GTGT-GAGGCTCAGAT-3' (23–37 п.н.) (см. Дополнительные материалы, рис. S3). Эта делеция не приводит к сдвигу рамки считывания, но в продукте трансляции отсутствовала аминокислотная последовательность RCVRL (7–11 а.о.). В гене *МрСРТ7.37* растений-нокаутов № 5 обнаружена вставка тимина: 5'-GTGGTGGACAGATGTTTGTG-3', – которая тоже приводит к сдвигу рамки считывания (Дополнительные материалы, рис. S4). В гене *МрСРТ7.37* растения-нокаута № 9 обнаружена делеция нуклеотида G в инициаторном кодоне: 5'-GTGGTGGACAGATGTGTGTG-3' (см. Дополнительные материалы, рис. S5). Все полученные линии растений имели мутации по типу вставки-делеции, что могло приводить к нарушению экспрессии гена *МрСРТ7.37* в растениях и к продукции белка с измененной аминокислотной последовательностью.

При изучении морфологии нокаутированных растений установлено, что все они жизнеспособны, морфологически не отличаются от растений дикого типа, а также формируют ризоиды и образуют выводковые почки (рис. 6).

Изучение антибактериальной активности экстрактов мутантных линий *M. polymorpha*

Нами проанализирована антибактериальная активность экстрактов тканей растений *M. polymorpha* дикого типа (Так-1 и Так-2) и нокаутов KO1, KO2, KO5 по отношению к тест-культуре бактерий грамположительного морфотипа *S. au-*

Таблица 2. Растения *M. polymorpha* Так-1, мутантные по гену *МрСРТ7.37*

| Линия растений | Мутация ^а |
|----------------|---|
| KO1 | Делеция GA: 5'-GTGGTGGACAg <u>ATG</u> TGTGTG-3' |
| KO2 | Делеция: 5'-gtgtgaggctcagat-3' (23–37 п.н.) |
| KO5 | Вставка T: 5'-GTGGTGGACAGAT <u>G</u> TTTGTG-3' |
| KO9 | Делеция G: 5'-GTGGTGGACAGAT <u>G</u> TGTGTG-3' |

^аПоследовательность, кодирующая инициаторный кодон мРНК, выделена подчеркиванием; строчными буквами обозначены делеции; жирным шрифтом – вставка нуклеотида.

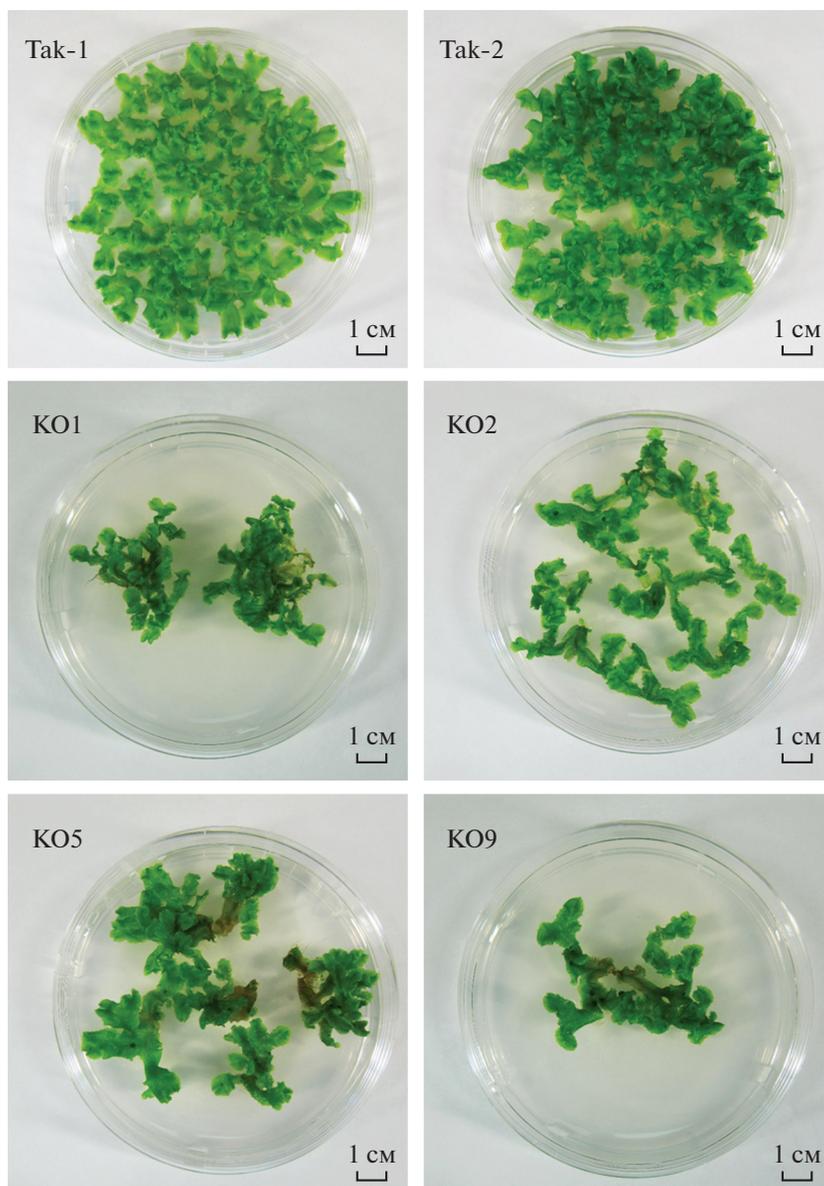


Рис. 6. Растения *M. polymorpha*. Tak-1, Tak-2 – дикий тип, мужское и женское растение соответственно. KO1, KO2, KO5, KO9 – линии растений-нокаутов по гену *MrCPT7.37*.

reus ATCC 25293. Антибактериальная активность выявлена как для растений дикого типа, так и нокаутов (рис. 7).

Средние значения зон ингибирования роста бактерий образцами экстрактов из тканей линий KO1 и KO2 превышали показания для экстрактов растений дикого типа, хотя статистической разницы не обнаружено (рис. 7б). Линия KO5 проявляла наиболее высокую антибактериальную активность ($p \leq 0.01$) среди всех проанализированных растений (рис. 7б). Не исключено, что это обусловлено или индивидуальными особенностями растения, или возможными нетаргетными мутациями в его геноме, произошедшими под

действием CRISPR/Cas9. На основании полученных результатов мы предполагаем, что нокаут гена *MrCPT7.37* не оказывает значимого влияния на пул вторичных метаболитов, обладающих антибактериальной активностью по отношению к грамположительным бактериям.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение вторичных метаболитов растений и путей их синтеза относится к направлениям, имеющим как фундаментальное, так и прикладное значение. Одна из малоисследованных групп вторичных метаболитов растений, в частности бриофитов, – полиизопренолы, а основной фермент,

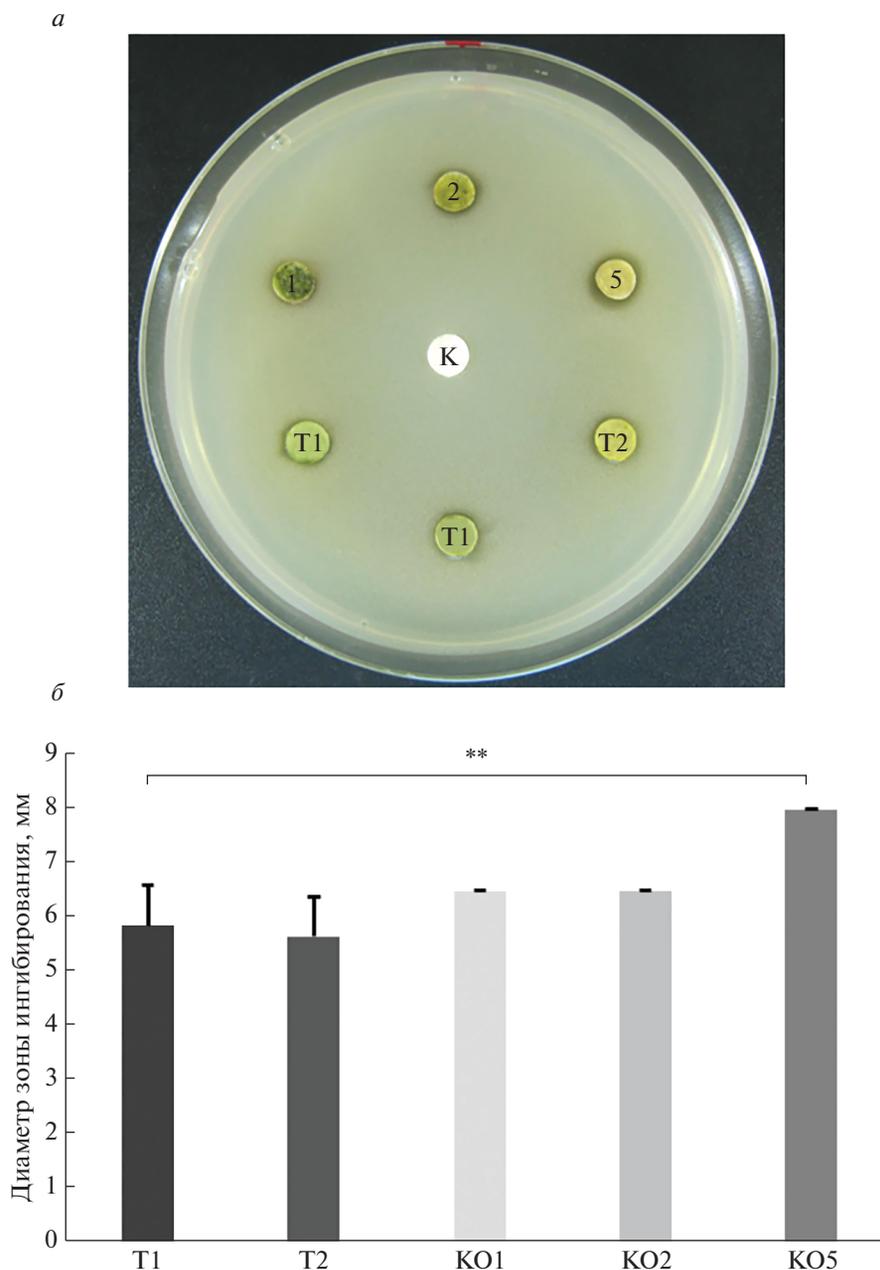


Рис. 7. Антибактериальная активность экстрактов тканей *M. polymorpha* по отношению к штамму *S. aureus* ATCC 25293. *a* – Рост культур; *б* – диаметр зоны ингибирования роста бактерий. T1, T2 – дикий тип *M. polymorpha*, линии Tak-1 и Tak-2 соответственно. 1 – KO1, 2 – KO2, 5 – KO5 – линии растений-нокаутов. К – отрицательный контроль (диск с метанолом). ** $p \leq 0.01$.

ответственный за их синтез, – *цис*-пренилтрансфераза.

Геном M. polymorpha содержит семь генов цис-пренилтрансфераз

В отличие от клеток животных для растений характерно наличие множества генов СРТs, группируемых в семейства, что связано с дупликацией генов и геномов в ходе эволюции. Так, у томата

(*Solanum lycopersicum*) обнаружено 7 генов СРТs (*SICPT1–SICPT7*), у тропического растения гевеи (*Hevea brasiliensis*) – два гена (*HPT1* и *HPT2*), у одуванчика (*Taraxacum kok-saghyz*) – три гена (*TkCPT1–TkCPT3*), в геноме лилии (*Lilium longiflorum*) – только один (*LAA66*) [11]. Дупликации участков генов и полногеномные дупликации, приводящие к неофункционализации, вносят основной вклад в метаболическое разнообразие растений. Известно, что дупликация генов чаще встре-

чается именно в царстве растений. Скорее всего, это связано с прикрепленным образом жизни и необходимостью быстро адаптироваться к изменениям окружающей среды. Также дупликация и кластеризация генов в основном связана со вторичным метаболизмом, хотя появление изоформ можно наблюдать и для ферментов первичного метаболизма [1].

Геном модельного растения *A. thaliana* содержит 9 генов СРТs (*AtCPT1–AtCPT9*), экспрессия которых тканеспецифична [8]. Проведенный нами биоинформатический анализ генома *M. polymorpha* позволил идентифицировать 7 генов, гомологичных генам СРТs *A. thaliana*. Шесть генов аннотированы как гены СРТs типа 7 соответственно гомологии с *AtCPT7 A. thaliana*. При выравнивании аминокислотных последовательностей нами показано, что филогенетически близки *AtCPT7* белки *MrCPT7.26*, *MrCPT7.37* и *MrCPT7.42*. Гены двух других ферментов: *MrCPT7.25 (Mapoly0087s0025)* и *MrCPT7.48 (Mapoly0025s0048)* – имели более высокую гомологию с генами *A. thaliana* СРТs типа 3 (*AtCPT3*), чем типа 7 (*AtCPT7*). На основании высокой гомологии идентифицированных *MrCPTs* только с *AtCPT3* и *AtCPT7* логично предположить, что эти два типа СРТs филогенетически наиболее древние у наземных растений и в процессе эволюции могли дивергировать в другие семейства. Вероятно, большое разнообразие СРТs необходимо растениям для синтеза полиизопренолов не только различной длины, но и различной внутриклеточной локализации, что, в свою очередь, может быть связано со специфичными функциями полиизопренолов разной длины [8, 23].

Известно, что СРТ3 и СРТ7 характеризуются конститутивной экспрессией в большинстве тканей растений. В *A. thaliana* *AtCPT7* и *AtCPT3* локализируются соответственно в мембранах хлоропластов и цитозоле клеток. Локализация *AtCPT7* в тилакоидах пластид *A. thaliana* объясняет широкое распространение этого белка в тканях растений. СРТs типа 7 участвуют в синтезе полипренолов, причем *AtCPTs* других семейств (цитозольные и митохондриальные) также синтезируют полипренолы [8]. В *A. thaliana* функциональная активность *AtCPT3* зависит от другого белка – LEW1: их гетеромер катализирует синтез долихолов. Обнаружено, что мутация в гене белка LEW1 приводит к снижению содержания долихолов в тканях *A. thaliana* на 85% [8, 24]. Скорее всего, в *M. polymorpha* не только *MrCPT3*, гомологичный *AtCPT3*, но и *MrCPT7.25* и *MrCPT7.48* могут принимать участие в синтезе долихолов.

Отсутствие в *M. polymorpha* генов других типов СРТs, имеющих в геноме *A. thaliana*, может быть обусловлено тем, что различные *MrCPTs* типа 7 синтезируют полиизопренолы разной дли-

ны, как в *A. thaliana* это делают СРТs нескольких семейств. Возможно, что в растении *M. polymorpha*, как представителе бриофитов [25], имеющих более простое строение, чем *A. thaliana*, *MrCPT7* и *MrCPT3* взаимозаменяемы или функционально вырождены.

Стоит заметить, что наличие трех высокоомологичных генов у *M. polymorpha* (*MrCPT7.26*, *MrCPT7.37* и *MrCPT7.42*) нехарактерно для бриофитов, так как геномы растений этой группы неизбыточны в отличие от сосудистых растений. Так, при анализе генома *M. polymorpha* установлено, что он не подвергался дупликации [25]. Тем не менее вероятны локальные дупликации, которые привели к появлению нескольких гомологичных генов СРТs у *M. polymorpha*.

Кроме того, при анализе аминокислотных последовательностей нами показано, что в структуре *AtCPTs* и *MrCPTs* присутствует шесть высококонсервативных областей, что также подтверждает высокую консервативность СРТs. Kharel и Коуама [26] идентифицировали консервативные последовательности в структуре СРТs, характерные как для эукариот, так и прокариот. В последовательностях СРТs из бактерий: *Micobacterium tuberculosis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* – и из архей *Sulfolobus acidocaldarius* картировано 5 консервативных регионов, присутствующих в СРТs *A. thaliana*. В структурах *MrCPTs* и *AtCPTs*, кроме этих пяти консервативных областей, обнаружен еще один общий участок – между четвертым и пятым (Дополнительные материалы, рис. S1), идентифицированными Kharel & Коуама [26]. Кроме того, по сравнению с последовательностями СРТs бактерий и архей, в белках растений мотив YxGxx(D/E/K)(V/I)(L/V/M/S)xA (204–214 а.о.) отличается большей вариабельностью.

Потеря функциональной активности MrCPT7.37 не влияет на жизнеспособность растения

Данные по исследованиям функций СРТs бриофитов отсутствуют. В геноме *M. polymorpha* нами обнаружено семь генов *MrCPTs*, гомологичных генам *AtCPT7* и *AtCPT3 A. thaliana*. Мы провели нокаут одного из генов *MrCPT7* и проанализировали его влияние на рост и развитие растений. С использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9 получено четыре индивидуальные линии растений-нокаутов по гену *MrCPT7.37* с различными мутациями. В трех линиях растений-мутантов (КО1, КО5 и КО9) обнаружен сдвиг рамки считывания, что может приводить к полному “выключению” экспрессии *MrCPT7.37* и к появлению преждевременных стоп-кодонов. В растениях линии КО2 идентифицирована 15-членная делеция в гене *MrCPT7.37*, которая приводит к изменению первичной струк-

туры продукта трансляции: отсутствию пептида CVRLR. Этот мотив не входит в высококонсервативные участки СРТs, но его отсутствие может влиять на посттрансляционную укладку белка и формирование его функционально активной формы.

Для всех трех линий мутантных растений (КО1, КО5, КО9), несмотря на нокаут гена *MrCPT7.37*, выявлено, что их фенотип близок таковому для дикого типа. Они формировали дорсо-вентральный дихотомически ветвящийся таллом, образовывали ризоиды и давали выводковые почки. Морфологических дефектов в развитии растений-мутантов не обнаружено. На основании данных проведенного нами биоинформатического анализа генов *MrCPTs* можно предположить, что отсутствие морфологических изменений и сохранение жизнеспособности растений обусловлено компенсацией функций *MrCPT7.37* двумя другими СРТs типа 7 – *MrCPT7.26* и *MrCPT7.42*.

В большинстве случаев нокаут генов СРТs у растений приводит не к морфологическим изменениям, а к изменениям в содержании полиизопренолов. Показано, что при инактивировании гена *AtCPT7* в *A. thaliana* снижается содержание полипренолов С45–С55 в мембранах тилакоидов [12]. Это приводит к повышению проницаемости мембран и снижению активности электронтранспортной цепи; при этом растения-мутанты сохраняли жизнеспособность. Растения, мутантные по гену *AtCPT6*, накапливали меньше долихолов С35 и короткоцепочечных долихолов [27]. При изучении роли *AtCPT1* показано, что в растениях *A. thaliana*, нокаутированных по гену *AtCPT1*, снижено содержание долихолов с длиной углеродной цепи от 18 до 23 [11]. Несмотря на то, что в большинстве случаев “выключение” генов, кодирующих *AtCPTs*, приводило к изменению в содержании полиизопренолов в мутантных растениях *A. thaliana*, а для мутантов по гену *AtCPT1* наблюдали сильную задержку роста и развитие укороченных корней [11]. По-видимому, СРТs могут влиять на рост и развитие растений, хотя изменения или не критичны, или, как в случае с *M. polymorpha*, компенсируются за счет функций гомологичных белков.

Мутации в гене MrCPT7.37 не влияют на антибактериальную активность экстрактов M. polymorpha

Вторичные метаболиты растений обладают большим потенциалом в качестве биологически активных соединений для промышленности и фармакологии. Например, длинноцепочечные соединения изопреноидной природы могут быть использованы в качестве антибактериальных и противоопухолевых препаратов. Так, показано,

что комплекс полипренолов из хвои сосны *Picea abies* L. и сосны *Pinus sylvestris* L. оказывает антиканцерогенный эффект в отношении простатической интраэпителиальной неоплазии и рака предстательной железы у крыс [28]. Полиизопренолы *Gingko biloba* обладают антибактериальной активностью по отношению к *E. coli* и *S. aureus*, а также цитотоксическим действием на линии раковых клеток А549 и HepG2 [10]. Для полипренолов и долихолов, экстрагированных из листьев мангровых деревьев, выявлена антибактериальная активность по отношению к *E. coli* и *S. aureus* [29]. Долихолы из мангровых деревьев *Ceriops tagal* и *Rhizophora mucronata* также проявляли противоопухолевую активность [30].

Мы провели первичный анализ антибактериальной активности общего пула внутриклеточных метаболитов растений *M. polymorpha* дикого типа и мутантов по гену *MrCPT7.37* и показали, что экстракты тканей всех линий ингибируют рост бактерий *S. aureus*, причем сходным образом. Только для одного растения, КО5 – с делецией в гене *MrCPT7.37*, – зарегистрировано значимое повышению антибактериальной активности экстракта. Нельзя исключить, что этот эффект обусловлен нетаргетной мутацией, появление которой возможно при редактировании генома растений с использованием системы CRISPR/Cas9 [31]. Кроме того, различия в антибактериальной активности между линиями растений могут быть связаны с индивидуальными особенностями конкретного растения и вызваны в том числе спонтанными мутациями. Так, у растений *A. thaliana* мутации накапливаются из поколения в поколение [32, 33].

Полученные нами данные по идентификации генов СРТs в *M. polymorpha* – первый и важный шаг в изучении этих ферментов в бриофитах. Дальнейшие исследования в этой области позволят лучше понять пути эволюции, а также роль *cis*-пренилтрансфераз в росте и развитии растений и их устойчивости к абиотическому и биотическому стрессу. Кроме того, глубокие знания о ферментах, участвующих в синтезе полиизопренолов, необходимы для понимания метаболизма последних и разработки способов их получения.

Мы благодарим профессора Такаюки Кочи (Prof. Takayuki Kohchi, Graduate School of Bio-studies, Kyoto University, Япония) за предоставление плазмид pMrGE_En03 и pMrGB011.

Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (№ 22-16-00138) и стипендии президента Российской Федерации (№ СП-3391.2021.4) в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Настоящая статья не содержит исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дополнительная информация для этой статьи доступна по <https://doi.org/10.31857/S0026898422060234> для авторизованных пользователей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fang C., Fernie A.R., Luo J. (2019) Exploring the diversity of plant metabolism. *Trends Plant Sci.* **24**, 83–98.
- Wang S., Alseikh S., Fernie A.R., Luo J. (2019) The structure and function of major plant metabolite modifications. *Mol. Plant.* **12**, 899–919.
- Chang H.-Y., Cheng T.-H., Wang A.H.-J. (2020) Structure, catalysis, and inhibition mechanism of prenyltransferase. *IUBMB Life.* **73**, 40–63.
- Yazaki K., Sasaki K., Tsurumaru Y. (2009) Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry.* **70**(15–16), 1739–1745.
- De Bruijn W.J.C., Levisson M., Beekwilder J., van Berkel W. J.H., Vincken J.-P. (2020) Plant aromatic prenyltransferases: tools for microbial cell factories. *Trends Biotechnol.* **38**(8), 917–934. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.006>
- Osorio M., Carvajal M., Vergara A., Butassi E., Zaccchino S., Mascayano C., Montoya M., Mejías S., Cortez-San Martín M., Vásquez-Martínez Y. (2021) Prenylated flavonoids with potential antimicrobial activity: synthesis, biological activity, and *in silico* study. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5472. <https://doi.org/10.3390/ijms22115472>
- Khodanovich M.Y., Pishchelko A.O., Glazacheva V.Y., Pan E.S., Krutenkova E.P., Trusov V.B., Yarnykh V.L. (2019) Plant polyprenols reduce demyelination and recover impaired oligodendrogenesis and neurogenesis in the cuprizone murine model of multiple sclerosis. *Phytother. Res.* **33**, 1363–1373.
- Kopcsayova D., Vranova E. (2019) Functional gene network of prenyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules.* **24**, 4556. <https://doi.org/10.3390/molecules24244556>
- Van Gelder K., Virta L.K.A., Easlick J., Prudhomme N., McAlister J.A., Geddes-McAlister J., Akhtar T.A. (2021) A central role for polyprenol reductase in plant dolichol biosynthesis. *Plant Sci.* **303**, 110773. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110773>
- Tao R., Wang C.-Z., Ye J.-Z., Zhou H., Chen H.-X., Zhang C.-W. (2016) Antibacterial, cytotoxic and genotoxic activity of nitrogenated and haloid derivatives of C50–C60 and C70–C120 polyprenol homologs. *Lipids Health Dis.* **15**, 175. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0345-x>
- Surowiecki P., Onysk A., Manko K., Swiezewska E., Surmacz L. (2019) Long-chain polyisoprenoids are synthesized by AtCPT1 in *Arabidopsis thaliana*. *Molecules.* **24**, 2789. <https://doi.org/10.3390/molecules24152789>
- Akhtar T.A., Surowiecki P., Siekierska H., Kania M., Van Gelder K., Rea K.A., Virta L.K.A., Vatta M., Gawarecka K., Wojcik J., Danikiewicz W., Buszewicz D., Swiezewska E., Surmacz L. (2017) Polyprenols are synthesized by a plastidial *cis*-prenyltransferase and influence photosynthetic performance. *Plant Cell.* **29**, 1709–1725.
- Zimmer A., Lang D., Richardt S., Frank W., Reski R., Rensing S.A. (2007) Dating the early evolution of plants: detection and molecular clock analyses of orthologs. *Mol. Genet. Genomics.* **278**, 393–402.
- Asakawa Y., Ludwiczuk A., Nagashima F. (2013) Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry.* **91**, 52–80.
- Asakawa Y., Ludwiczuk A. (2018) Chemical constituents of bryophytes: structures and biological activity. *J. Nat. Prod.* **81**, 641–660.
- Commisso M., Guarino F., Marchi L., Muto A., Piro A., Degola F. (2021) Bryo-activities: a review on how bryophytes are contributing to the arsenal of natural bioactive compounds against fungi. *Plants* (Basel). **10**(2), 203. <https://doi.org/10.3390/plants10020203>
- Sugano S.S., Shirakawa S., Takagi J., Matsuda Y., Shimada T., Hara-Nishimura I., Kohchi T. (2014) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* **55**(3), 475–481.
- Matsuda Y., Ishida S., Shimada T., Hara-Nishimura I., Osakabe K., Kohchi T. (2018) Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing and its application to conditional genetic analysis in *Marchantia polymorpha*. *PLoS One.* **13**(10), e0205117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205117>
- Höfgen R., Willmitzer L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9877.
- Tsuboyama-Tanaka S., Nonaka S., Kodama Y. (2015) A highly efficient AgarTrap method for genetic transformation of mature thalli of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Biotechnol.* **32**(4), 333–336. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.15.0813a>
- Takenaka M., Yamaoka S., Hanajiri T., Shimizu-Ueda Y., Yamato K.T., Fukuzawa H., Ohya K. (2000) Direct transformation and plant regeneration of the haploid liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Transgenic Res.* **9**, 179–185, 2000.
- Tamari F., Hinkley C.S., Ramprasad N. (2013) A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues. *J. Biomol. Tech.* **24**, 113–118. <https://doi.org/10.7171/jbt.13-2403-001>
- Grabinska K.A., Park E.J., Sessa W.C. (2016) *cis*-Prenyltransferase: new insights into protein glycosylation, rubber synthesis, and human diseases. *J. Biol. Chem.* **291**(35), 18582–18590.
- Surmacz L., Swiezewska E. (2011) Polyisoprenoids – secondary metabolites or physiologically important superlipids? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **407**, 627–632.
- Bowman J. L., Kohchi T., Katsuyuki Y., Jenkins J., Shu S., Ishizaki K., Yamaoka S., Nishihama R., Nakamura Y., Berger F., Adam C., Aki S. S., Althoff F.,

- Araki T., Arteaga-Vazquez M.A., Balasubramanian S., Barry K., Bauer D., Boehm C.R., Briginshaw L., Caballero-Perez J., Catarino B., Chen F., Chiyoda S., Chovatia M., Davies K.M., Delmans M., Demura T., Dierschke T., Dolan L., Dorantes-Acosta A.E., Eklund D.M., Florent S.N., Flores-Sandoval E., Fujiyama A., Fukuzawa H., Galik B., Grimanelli D., Grimwood J., Grossniklaus U., Hamada T., Haseloff J., Hetherington A.J., Higo A., Hirakawa Y., Hundley H.N., Ikeda Y., Inoue K., Inoue S.-i., Ishida S., Jia Q., Kakita M., Kanazawa T., Kawai Y., Kawashima T., Kennedy M., Kinose K., Kinoshita T., Kohara Y., Koide E., Komatsu K., Kopischke S., Kubo M., Kyozuka J., Lagercrantz U., Lin S.-S., Lindquist E., Lipzen A.M., Lu Ch.-W., De Luna E., Martienssen R.A., Minamino N., Mizutani Ma., Mizutani M., Mochizuki N., Monte I., Mosher R., Nagasaki H., Nakagami H., Naramoto S., Nishitani K., Ohtani M., Okamoto T., Okumura M., Phillips J., Pollak B., Reinders A., Rovekamp M., Sano R., Sawa S., Schmid M.W., Shirakawa M., Solano R., Spunde A., Suetsugu N., Sugano S., Sugiyama A., Sun R., Suzuki Y., Takenaka M., Takezawa D., Tomogane H., Tsuzuki M., Ueda T., Umeda M., Ward J.M., Watanabe Y., Yazaki K., Yokoyama R., Yoshitake Y., Yotsui I., Zachgo S., Schmutz J. (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell*. **171**, 287–304.
26. Kharel Y., Koyama T. (2003) Molecular analysis of *cis*-prenyl chain elongating enzymes. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 111–118.
27. Surmacz L., Plochocka D., Kania M., Danikiewicz W., Swiezewska E. (2014) *cis*-Prenyltransferase AtCPT6 produces a family of very short-chain polyisoprenoids in planta. *Biochim. Biophys. Acta*. **1841**, 240–250.
28. Муразов Я.Г., Нюганен А.О., Артемьева А.С. (2021) Оценка химиопрофилактического потенциала полипrenoлов из хвои *Picea abies* L. и *Pinus sylvestris* L. на модели канцерогенеза предстательной железы у самцов Wistar. *Вопросы питания*. **90**(3), 104–115.
29. Sumardi S., Basyuni M., Wati R. (2018) Antimicrobial activity of polyisoprenoids of sixteen mangrove species from North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*. **19**(4), 1243–1248.
30. Istiqomah M.A., Hasibuan P.A.Z., Nuryawan A., Sumaiyah S., Siregar E.S., Basyuni M. (2021) The anti-cancer compound dolichol from *Ceriops tagal* and *Rhizophora mucronata* leaves regulates gene expressions in WiDr colon cancer. *Sains Malaysiana*. **50**(1), 181–189.
31. Hahn F., Nekrasov V. (2018) CRISPR/Cas precision: do we need to worry about off-targeting in plants? *Plant Cell Rep.* **38**(4), 437–441. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2355-9>
32. Ossowski S., Schneeberger K., Lucas-Lledo J.I., Warthmann N., Clark R.M., Shaw R.G., Weigel D., Lynch M. (2010) The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. **327**(5961), 92–94.
33. Lu Z., Cui J., Wang L., Teng N., Zhang S., Lam H.-M., Zhu Y., Xiao S., Ke W., Lin J., Xu C., Jin B. (2021) Genome-wide DNA mutations in *Arabidopsis* plants after multigene rational exposure to high temperatures. *Genome Biol.* **22**, 160.

***cis*-Prenyltransferases of *Marchantia polymorpha*: Phylogenetic Analysis and Perspectives for Use as Regulators of Antimicrobial Agents' Synthesis**

L. R. Valeeva^{1, *}, S. M. Dzhabrailova¹, and M. R. Sharipova¹

¹*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

*e-mail: liarvaleeva@gmail.com

The synthesis of secondary metabolites plays one of the central roles in the survival of plants and their resistance to biotic and abiotic stress. Nevertheless, fundamental and applied studies of plant secondary metabolites, polyisoprenols, remain less developed. However, a wide distribution of polyisoprenols in plants shows their important role in cellular metabolism. Plant polyisoprenols are synthesized by *cis*-prenyltransferases (CPTs), the study of which is necessary to understand the synthesis pathways, localization, and functions of plant polyisoprenols. Bryophytes, including liverwort *Marchantia polymorpha*, are a unique group of plants with great potential for the study of CPTs. We analyzed the genome of *M. polymorpha* and identified seven CPTs genes homologous to *AtCPT7* and *AtCPT3* genes of *Arabidopsis thaliana*, which involved in the synthesis of polyisoprenols. Four individual lines of *M. polymorpha* plants with mutations in *MpCPT7.37* gene were obtained. It was shown that in three lines the mutation led to a translational frameshift and gene knockout. However, knockout of only the type 7 of CPTs had no effect on plant growth and survival. Analysis of the antibacterial activity of mutant plant tissue extracts did not reveal significant changes compared to wild-type tissue extracts that could be related to a compensatory effect of the activity of other CPTs. These data give us the necessary base for the further studies of bryophyte CPTs and their products.

Ключевые слова: *cis*-prenyltransferases, polyisoprenols, bryophytes, *Marchantia polymorpha*, secondary metabolites, antibacterial activity, CRISPR/Cas9

УДК 577.29

ТРАНСГЕНЕЗ В ЧЕРВЯХ: ПРЕТЕНДЕНТЫ НА ИДЕАЛЬНУЮ МОДЕЛЬ

© 2022 г. И. С. Сухих^а, *, М. Ю. Бирюков^а, А. Г. Блинов^а, **^а Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: igor3419@gmail.com

**e-mail: blinov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 13.05.2022 г.

После доработки 23.06.2022 г.

Принята к публикации 28.06.2022 г.

Трансгенез – важный и зачастую необходимый метод для изучения многих процессов жизнедеятельности животных. Чтобы создать линии трансгенных животных, необходимы подходящие модельные организмы, которые имели бы полезные особенности для эффективного и доступного трансгенеза. В обзоре охарактеризованы существующие модельные организмы различных таксонов червей, для которых показан эффективный метод трансгенеза. Особое внимание уделено плоским червям, в частности *Macrostomum lignano* – как перспективному модельному организму для изучения процессов старения, регенерации и канцерогенеза.

Ключевые слова: плоские черви, *Macrostomum lignano*, трансгенез, модельные организмы, транспозоны

DOI: 10.31857/S0026898422060210

ВВЕДЕНИЕ

Для изучения функции генов в ходе онкогенеза, регенерации, старения, заболеваний и визуализации тканей и органов часто используют трансгенных животных, несущих в своем геноме искусственно введенные генные конструкции [1–9]. Такие трансгены позволяют локализовать клетки, в которых экспрессируются интересные гены, а также вносить функциональные изменения в работу клеток [10]. Выбор оптимальных модельных организмов – важный, возможно, ключевой момент в создании трансгенных животных для подобных исследований. Очевидно, что для медицины желательно использовать физиологически наиболее приближенные к человеку модельные организмы (такие как мыши, овцы, обезьяны и другие млекопитающие), однако далеко не всегда разумно использовать именно их [11]. Затраты на содержание, время смены поколений и скорость развития не позволяют быстро и доступно изучать многие процессы, связанные со старением и развитием тканей на примере млекопитающих [5, 10]. Более того, изучение регенерации, а также многих других процессов на моделях млекопитающих и других позвоночных весьма ограничено.

При выборе подходящих трансгенных кандидатов стоит искать модельные организмы, которые удовлетворяли бы следующим требованиям: 1) относительная простота содержания и поддер-

жания культур животных; 2) возможность разработки эффективного и воспроизводимого метода получения трансгенных линий; 3) быстрая скорость роста и развития до половозрелого состояния, быстрая смена поколений; 4) наличие полногеномной сборки.

Стоит отметить, что получение трансгенных линий напрямую зависит от возможности и доступности микроинъекций или других методов создания трансгенных линий. Еще одно важное достоинство – простота проверки встройки трансгена, так как процент успешного трансгенеза редко достигает больших значений. Таким образом, простой скрининг, например использование флуоресцентных белков при прозрачном теле модельного организма, будет большим преимуществом [2, 12]. Дополнительным преимуществом для любого модельного организма будет возможность применения методов редактирования генома, например с помощью системы CRISPR-Cas9, которая получила широкое распространение в последние годы благодаря эффективности и доступности [13].

Очевидно, что наибольшую скорость роста и развития, а также смены поколений стоит искать среди видов беспозвоночных. Как правило, чем проще устроен организм, тем его легче содержать и тем быстрее происходит смена поколений. Кроме того, для работы с большинством беспозвоночных видов не требуется соблюдения специ-

альных этических норм, что облегчает работу с ними [14]. Однако модельный организм должен обладать достаточной высокой степенью организации, чтобы на нем можно было изучать интересные процессы. Учитывая все вышеперечисленное, логично заключить, что модельные организмы, удовлетворяющие данным требованиям, стоит искать среди различных таксонов червей.

ТРАНСГЕНЕЗ В ЧЕРВЯХ – МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМАХ

Среди беспозвоночных существует широкий спектр модельных организмов, однако далеко не для всех успешно созданы трансгенные линии [2, 4, 7, 8, 12, 15]. При изучении процессов старения, регенерации и прочих связанных с ними механизмов имеет смысл искать модели среди червей различных групп. Одним из самых успешных и известных примеров является *Caenorhabditis elegans* [15, 16]. Интерес представляют также *Hofstenia miamia* [12] и плоские черви [2, 7, 8]. В табл. 1 приведены основные характеристики наиболее известных модельных объектов среди червей.

Caenorhabditis elegans

C. elegans уже долгие годы служит популярным модельным организмом для изучения регенерации и старения, а также многих других процессов. Метод трансгенеза показан для данного круглого червя [16], также разработан эффективный протокол микроинъекций для создания трансгенных линий [17]. Более того, для *C. elegans* получены эффективные методы редактирования генома с помощью системы CRISPR-Cas9 [18]. Таким об-

разом, как модель *C. elegans* привлекательна тем, что позволяет использовать обширный спектр различных методов манипуляции с геномом.

Взрослый червь имеет размер всего около 1 мм и является самооплодотворяющимся гермафродитом. *C. elegans* достигает половозрелости через 2.5–4 суток после вылупления из яйца и живет примерно 18–20 суток при температуре 20°C [19]. Благодаря небольшому размеру и неприхотливости в пище *C. elegans* достаточно прост в содержании и разведении в больших количествах (~250 червей за несколько дней). Более того, этот круглый червь обладает высокой степенью геномной гомологии с человеком (60–80%), что позволяет использовать его в качестве модели для тестирования многих лекарств [5]. Благодаря большому интересу исследователей к *C. elegans* в последние десятилетия, полностью собран его геном и разработаны многие молекулярно-биологические методы для его изучения, такие как трансгенез, РНК-интерференция и нокаут генов [20]. Быстрое развитие и размножение *C. elegans* позволяет использовать этот вид как хорошую модель для скрининга препаратов, направленных на замедление старения, а также для изучения старения в целом [21]. Так, например, Machino с соавт. [22] показали, что линия *C. elegans*, несущая трансген бета-амилоида 1–42 (A β) человека под контролем нейронспецифичного промотора, приводит к снижению локомотории червей в восемь раз, и это согласуется с данными, полученными при наблюдении пациентов с болезнью Альцгеймера. В другой работе, Sonowal с соавт., установлено, что индол-3-карбоксальдегид и индолуксусная кислота могут увеличивать продолжительность жизни *C. elegans*. Эти соединения также эффективны в отношении

Таблица 1. Характеристики различных видов червей, которые важны при создании трансгенных линий для изучения старения, регенерации и канцерогенеза

| Характеристики | Вид/тип | | | | |
|--|---|--|--|--|---|
| | <i>Caenorhabditis elegans</i> / Nematoda | <i>Hofstenia miamia</i> / Xenacoelomorpha | <i>Schmidtea mediterranea</i> / Platyhelminthes | <i>Girardia tigrina</i> / Platyhelminthes | <i>Macrostomum lignano</i> / Platyhelminthes |
| Одноклеточные оплодотворенные яйца | + | + | – | – | + |
| Размер тела, мм | 1 | 2–2.5 | 20 | 5–10 | 0.9 |
| Прозрачность тела | + | + | –/+ | –/+ | + |
| Время достижения половозрелости, сутки | 2.5–4 | 40–60 | 170–180 | 170–180 | 15–30 |
| Высокая способность к регенерации | + | + | + | + | + |
| Наличие геномной сборки | + | + | + | + | + |
| Продолжительность жизни | 18–20 суток | Не установлена | ~3 года | ~3 года | 2–3 года |
| Наличие неопластов | – | + | + | + | + |

дрозофилы и мышей, что позволяет говорить о потенциальном использовании об их в качестве кандидатов для создания лекарств, способствующих увеличению продолжительности жизни [23].

Таким образом, неудивительно, что *C. elegans* давно зарекомендовал себя как хороший модельный объект для изучения регенерации и старения, а также для первичного скрининга лекарств. Однако стоит отметить, что у *C. elegans* нет неопластов — стволовых клеток, опосредующих регенерацию, — поэтому изучение регенерации и восстановления частей тела на этих червях ограничено [24].

Hofstenia miamia

В отличие от *C. elegans*, *Hofstenia miamia* лишь недавно предложен как модельный организм для изучения стволовых клеток, регенерации и развития. Однако этот вид имеет большой потенциал в таких исследованиях. В статье Ricci с соавт. [12] представлен эксперимент по успешному созданию трансгенных линий турбеллярии *H. miamia* методом микроинъекций плазмид, несущих трансген. Также авторами установлена возможность редактирования генома с помощью системы CRISPR-Cas9 путем микроинъекции белка Cas9 и соответствующей гидовой РНК. *H. miamia* — представитель типа Xenacoelomorpha, базальный таксон билатеральных животных [25], относится к более древнему виду, чем большинство червей-моделей. Эти черви способны к регенерации всего тела с помощью популяции стволовых клеток — неопластов, что позволяет использовать их как модель для изучения регенерации. *H. miamia* обладает прозрачным телом, что дает возможность использовать флуоресцентные белки для мониторинга встройки трансгенов, а также визуализации различных органов и тканей [12].

H. miamia имеет значительно более длинный жизненный цикл, чем *C. elegans*: червь становится взрослым примерно через два месяца после откладки яйца. Данная особенность может быть полезна для изучения ранних стадий развития червя, однако относительно медленная смена поколений делает создание трансгенных линий затруднительным. В случае, когда трансген оказывает влияние на поздние стадии развития червя, необходимо ждать около двух месяцев для проверки влияния трансгена, что удлиняет время эксперимента [26]. Также определенные неудобства для трансгенеза вызывает отсутствие возможности искусственно индуцировать откладку яиц, что приводит к необходимости собирать оплодотворенные яйца в течение дня перед каждым раундом микроинъекций. Более того, некоторые участки генома имеют очень низкий GC-состав, что затрудняет картирование

трансгена в случае, если встройка происходит в такие районы [12].

Таким образом, *H. miamia* — молодой модельный организм с достаточным потенциалом для изучения регенерации частей тела, а также процессов, запускаемых при образовании ран и повреждении тканей.

ПЛОСКИЕ ЧЕРВИ

В последние десятилетия растет интерес к таксону плоских червей как к новому типу модельных организмов. Наличие специальных клеток — неопластов — позволяет плоским червям восстанавливать части тела после значительных повреждений, что делает их подходящими объектами для изучения важных процессов, таких как регенерация и старение [27]. Несмотря на то, что для большинства плоских червей-моделей не разработан протокол геномного редактирования, больших успехов в этом достигли Sankaranarayanan с соавт. [28]. Они показали возможность создания больших делеций с помощью системы CRISPR-Cas9 в геноме плоского червя *Schistosoma mansoni*, относящегося к паразитам животных и человека. Данный факт говорит о том, что для плоских червей, в целом, есть возможность редактирования генома с помощью современных, эффективных систем. В последние годы многими исследователями предложены различные виды плоских червей в качестве модельных организмов: *Schmidtea mediterranea*, *Girardia tigrina* и *Macrostomum lignano* [2, 7, 8].

Schmidtea mediterranea

S. mediterranea — свободноживущий плоский червь, который способен размножаться как асексуально, так и половым способом. Этот червь имеет размеры около 2 мм и неприхотлив в содержании [29]. Невероятная способность к регенерации благодаря неопластам сделала *S. mediterranea* одним из основных модельных организмов для изучения регенерации и восстановления органов и тканей. Несмотря на длительное время изучения, для *S. mediterranea* не разработано эффективного и простого механизма трансгенеза [8]. Создание трансгенных линий *S. mediterranea* осложнено многими факторами, такими как неэффективная доставка генетического материала в клетки, непрозрачное тело и отсутствие доступных стабильных линий, способных размножаться половым путем. Большая часть линий планарий размножаются исключительно бесполом путем при разделении червя на части с последующей регенерацией [30]. Однако, даже при наличии линии, размножающейся половым путем, обычный метод микроинъекций для доставки трансгена весьма затруднителен, так как планарии откладывают капсулы

с яйцами, в которых зиготы распределены среди большого количества клеток желтка [29, 31].

Ближе всего к решению данных проблем подошли Hall с соавт. [8], создав набор методов, основанных на трансфекции мРНК, кодирующей нанолуциферазу в соматических клетках червя, что позволило им измерять уровень экспрессии белка методами спектро- и микроскопии. Проблемы доставки мРНК решены с использованием нанотрубок из оксида алюминия и химического реагента для трансфекции. Из трех протестированных реагентов — Lipofectamine 3000, Trans-IT и Viromer — выбран последний, как наиболее эффективный по силе получаемого сигнала. Также решена проблема аутофлуоресценции червя, что позволило Hall с соавт. визуализировать клетки *S. mediterranea*, в которых происходила экспрессия репортерного белка. С этой целью ими исследована нанолуцифераза Nluc, полученная из креветки *Oplophorus gracilirostris*, которая дает сигнал, на порядок превышающий свечение других люцифераз [32]. Использование такой люциферазы позволяет регистрировать даже слабый сигнал экспрессии белка [8].

S. mediterranea была и будет значимым модельным организмом для изучения регенерации, однако использование трансгенов для изучения регенерации все еще остается невозможным. Создание и поддержание трансгенных линий также затруднено длительным периодом развития этого червя до взрослого состояния — около полугода. Таким образом, в случае *S. mediterranea* возникает та же проблема, что и для *H. miamia*, при использовании в исследованиях, связанных со сменой поколений, хотя ее можно обойти путем создания множества трансгенных линий в короткие сроки.

Girardia tigrina

Girardia tigrina, также как и *S. mediterranea*, представитель семейства Dugesidae, имеют множество особенностей, приведенных в табл. 1 [33]. Задолго до экспериментов по созданию трансгенных линий *S. mediterranea*, проведенных Hall с соавт. [8], показано успешное создание трансгенных линий *G. tigrina* методом микроинъекции транспозонных векторов в полость кишечника и паренхиму с последующей электропорацией. González-Estévez и соавт. [7] тестировали три разных транспозона в качестве возможных векторов для встройки гена флуоресцентного белка EGFP под контролем промотора P3, который работает в фоторецепторных клетках. Так как *G. tigrina* не обладает прозрачным телом, авторы выбрали глаза как орган, в котором флуоресценцию относительно легко регистрировать по сравнению с остальным телом. После микроинъекции и электропорации получены черви с мозаичным типом трансгенных вставок, что не соответствует пол-

ноценной трансгенной линии. Однако мозаичность присутствовала даже после нескольких циклов деления и регенерации, что говорит об устойчивом наследовании необластов в ряду поколений. Кроме того, авторы получили гомогенные линии из этих мозаичных линий путем регенерации необластов, несущих трансген [7]. Из трех использованных векторов наилучшие результаты были получены для транспозонов *Hermes* и *piggyBac*. Эффективность встраивания транспозона mariner была ниже. Таким образом, González-Estévez с соавт. [7] установили возможность создания трансгенных линий планарий. Однако все ограничения, связанные с использованием *S. mediterranea* как модельного организма для изучения старения: длительный период развития организма до половозрелого состояния и непрозрачное тело, — актуальны и в случае *G. tigrina*.

Macrostomum lignano

M. lignano представляет собой один из самых многообещающих модельных организмов для изучения процессов старения, регенерации и онкогенеза. До сих пор естественные случаи опухолеобразования не обнаружены у *M. lignano*, несмотря на высокую степень пролиферации стволовых клеток. Более того, этот червь обладает высокой резистентностью к внешним источникам повреждения ДНК, таким как ионизирующее излучение и химические канцерогены [34, 35].

Свободноживущий плоский червь *M. lignano* — это гермафродит, не обладающий способностью к самооплодотворению, имеет прозрачное тело и размер всего около 0.9 мм. Культуры данных червей легко поддерживать в больших количествах без значительных затрат. Черви откладывают по одному оплодотворенному яйцу один—два раза в сутки и даже в условиях голодания в течении трех—четырех дней. Только что отложенное яйцо находится на стадии одной клетки, что позволяет производить трансгенез методом микроинъекции. Через четыре—пять дней из яйца вылупляется червь, который примерно через 20—30 суток может давать потомство. Все эти особенности делают трансгенез этих червей не только возможным, но и удобным. В случае *M. lignano* уже разработан стабильно работающий метод трансгенеза на основе случайной интеграции, в результате которой получено несколько трансгенных линий [2, 36]. Помимо метода трансгенеза на основе случайной интеграции, недавно успешно созданы две трансгенные линии *M. lignano* с помощью векторной системы на основе транспозона *piggyBac* [37]. Положительный фактор — прочитанный и аннотированный геном [2]. Более того, разработаны протоколы проведения нокдауна генов методом РНК-интерференции путем простого помещения червей в раствор с двухцепочечной РНК. Несмотря

ря на то, что до сих пор не опубликован протокол геномного редактирования с помощью системы CRISPR-Cas9 для *M. lignano*, существенных препятствий для использования этого метода нет, особенно учитывая успехи применения CRISPR на шистосомах [28]. Возможность одновременной микроинъекции нуклеиновых кислот и белков в одноклеточные яйца может стать отличным заделом для доставки нуклеазы Cas9, гидовой РНК и матрицы ДНК в клетки. Таким образом, можно ожидать, что вскоре будет разработан эффективный протокол геномного редактирования *M. lignano* на основе системы CRISPR-Cas9. Такой метод создания линий червей-нокаутов, или нокинов, сделает *M. lignano* еще более привлекательным для исследователей. Более подробно биология и физиология *M. lignano* описана в обзорах Wudarski и др. [38] и Mouton и др. [39].

Недавно показано, что геном *M. lignano* подвергнулся дубликации с последующим слиянием одного гаплоидного набора хромосом в одну метацентрическую хромосому [40, 41]. Эта дубликация чрезвычайно интересна для изучения эволюции строения генома и хромосом, а также защиты генома *M. lignano* от повреждений. Однако она может быть недостатком при верификации успешности трансгенеза, так как точное картирование места встройки в трансгенную линию становится затруднительным.

Несмотря на то, что *M. lignano* представляет удобную модель для изучения фундаментальных клеточных процессов в ходе регенерации, старении и развитии, данный червь может быть использован и в исследованиях с более практическим уклоном. Так *M. lignano* может найти применение в разработке методов лечения шистосомозов, вызываемых паразитическими плоскими червями рода *Schistosoma*. Поиск жизненно необходимых генов, специфичных для плоских червей, может дать ученым дополнительные цели для сайленсинга в геноме шистосомы, а следовательно, появится возможность целенаправленно редактировать геном паразитов для лечения пораженного им организма.

Таким образом, *M. lignano* представляет собой наиболее удобную модель среди плоских червей для изучения множества процессов и может служить хорошей альтернативой *C. elegans* в исследованиях стволовых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для изучения таких процессов, как регенерация, старение и канцерогенез, необходимы моделирующие с модельными организмами, для которых будут разработаны методы трансгенеза. Согласно критериям, приведенным в данном обзоре, наилучшей моделью для создания трансгенных линий служит плоский червь *M. lignano* и

хорошо зарекомендовавший себя круглый червь *C. elegans*. Благодаря быстрому росту и развитию до половозрелого состояния, при достаточно большой продолжительности жизни эти виды червей имеют большой потенциал для использования в качестве моделей при изучении процессов старения и канцерогенеза. Однако *M. lignano* имеет преимущество при исследовании процессов регенерации по сравнению с *C. elegans* из-за наличия стволовых клеток необластов. Планарии и *Hofstenia*, в свою очередь, могут служить отличными модельными организмами для изучения регенерации и эмбрионального развития.

Работа поддержана Российским научным фондом (№ 20-14-00147) и государственным бюджетным проектом (№ FWNR-2022-0016).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murthy M., Ram J.L. (2015) Invertebrates as model organisms for research on aging biology. *Invertebr. Reprod. Dev.* **59**, 1–4. <https://doi.org/10.1080/07924259.2014.970002>
- Wudarski J., Simanov D., Ustyantsev K., De Mulder K., Grelling M., Grudniewska M., Beltman F., Glazenburg L., Demircan T., Wunderer J., Qi W., Vizoso D.B., Weissert P.M., Olivieri D., Mouton S., Guryev V., Aboobaker A., Schäfer L., Ladurner P., Berezikov E. (2017) Efficient transgenesis and annotated genome sequence of the regenerative flatworm model *Macrostomum lignano*. *Nat. Commun.* **8**(1), 2120. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02214-8>
- Zabelina V., Vrhotova M., Yonemura N., Sezutsu H., Tamura T., Klymenko V., Sehna F., Zurovec M., Sehadova H., Sauman I. (2022) The exact timing of microinjection of parthenogenetic silkworm embryos is crucial for their successful transgenesis. *Front. Physiol.* **13**, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.822900>
- Zayas R.M., Hernández A., Habermann B., Wang Y., Sary J.M., Newmark P.A. (2005) The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: analysis of ESTs from the hermaphroditic strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 18491–18496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509507102>
- Zhang S., Li F., Zhou T., Wang G., Li Z. (2020) *Caenorhabditis elegans* as a useful model for studying aging mutations. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.554994>
- Bely A.E., Sikes J.M. (2010) Acoel and platyhelminth models for stem-cell research. *J. Biol.* **9**(2), 14. <https://doi.org/10.1186/jbiol223>
- González-Estévez C., Momose T., Gehring W.J., Saló E. (2003) Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-spe-

- cific GFP marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 14046–14051.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2335980100>
8. Hall R.N., Weill U., Khariton M., Leal-Ortiz S., Drees L., Chai C., Xue Y., Rosental B., Quake S.R., Sánchez A., Melosh N.A., Fire A., Rink J.C., Wang B. (2021) Heterologous reporter expression in the planarian *Schmidtea mediterranea* through somatic mRNA transfection. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2021.04.20.440701>
 9. Sasakura Y., Oogai Y., Matsuoka T., Satoh N., Awazu S. (2007) Transposon mediated transgenesis in a marine invertebrate chordate: *Ciona intestinalis*. *Genome Biol.* **8**(Suppl. 1), S3.
<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s3>
 10. Sosa M.A.G., De Gasperi R., Elder G.A. (2010) Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct. Funct.* **214**, 91–109.
<https://doi.org/10.1007/s00429-009-0230-8>
 11. Costantini F. (2013) Transgenic animals. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd ed., vol. 7. Elsevier Inc., pp. 117–123.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01560-6>
 12. Ricci L., Srivastava M. (2021) Transgenesis in the acoel worm *Hofstenia miamia*. *Dev. Cell.* **56**, 3160–3170.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.10.012>
 13. Adli M. (2018) The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* **9**(1), 1911
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
 14. Drinkwater E., Robinson E.J.H., Hart A.G. (2019) Keeping invertebrate research ethical in a landscape of shifting public opinion. *Methods Ecol. Evol.* **10**, 1265–1273.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.13208>
 15. Link C.D. (2001) Transgenic invertebrate models of age-associated neurodegenerative diseases. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 1639–1649.
[https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00291-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00291-3)
 16. Mello C.C., Kramer J.M., Stinchcomb D., Ambros V. (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* **10**, 3959–3970.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04966.x>
 17. Nance J., Frøkjær-Jensen C. (2019) The *Caenorhabditis elegans* transgenic toolbox. *Genetics.* **212**(4), 959–990.
<https://doi.org/10.1534/genetics.119.301506>
 18. Dickinson D.J., Goldstein B. (2016) CRISPR-based methods for *Caenorhabditis elegans* genome engineering. *Genetics.* **202**, 885–901.
<https://doi.org/10.1534/genetics.115.182162>
 19. Hertweck M., Hoppe T., Baumeister R. (2003) *C. elegans*, a model for aging with high-throughput capacity. *Exp. Gerontol.* **38**, 345–346.
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00208-5)
 20. Matsunami K. (2018) Frailty and *Caenorhabditis elegans* as a benchtop animal model for screening drugs including natural herbs. *Front. Nutr.* **5**, 3–8.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00111>
 21. David D.C., Ollikainen N., Trinidad J.C., Cary M.P., Burlingame A.L., Kenyon C. (2010) Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol.* **8**, 47–48.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000450>
 22. Machino K., Link C.D., Wang S., Murakami H., Murakami S. (2014) A semi-automated motion-tracking analysis of locomotion speed in the *C. elegans* transgenics overexpressing beta-amyloid in neurons. **5**, 202.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00202>
 23. Sonowal R., Swimm A., Sahoo A., Luo L., Matsunaga Y., Wu Z., Bhingarde J.A. (2017) Indoles from commensal bacteria extend healthspan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 7506–7515.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1706464114>
 24. Sánchez Alvarado A. (2007) Stem cells and the planarian *Schmidtea mediterranea*. *C. R. Biol.* **330**, 498–503.
<https://doi.org/10.1016/j.crvi.2007.05.005>
 25. Hooge M., Wallberg A., Todt C., Maloy A., Jondelius U., Tyler S. (2007) A revision of the systematics of panther worms (*Hofstenia* spp., Acoela), with notes on color variation and genetic variation within the genus. *Hydrobiologia.* **592**, 439–454.
<https://doi.org/10.1007/s10750-007-0789-0>
 26. Kimura J.O., Ricci L., Srivastava M. (2021) Embryonic development in the acoel *Hofstenia miamia*. *Dev.* **148**(13), dev188656.
<https://doi.org/10.1242/DEV.188656>
 27. Scimone M.L., Kravarik K.M., Lapan S.W., Reddien P.W. (2014) Neoblast specialization in regeneration of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem. Cell Rep.* **3**, 339–352.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.06.001>
 28. Sankaranarayanan G., Coghlan A., Driguez P., Lotkowska M.E., Sanders M., Holroyd N., Tracey A., Berrihan M., Rinaldi G. (2021) Large CRISPR-Cas-induced deletions in the oxamniquine resistance locus of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Wellcome Open Res.* **5**, 178.
<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16031.2>
 29. Newmark P.A., Alvarado A.S. (2002) Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 210–219.
<https://doi.org/10.1038/nrg759>
 30. Arnold C.P., Benham-Pyle B.W., Lange J.J., Wood C.J., Sánchez Alvarado A. (2019) Wnt and TGFβ coordinate growth and patterning to regulate size-dependent behaviour. *Nature.* **572**, 655–659.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1478-7>
 31. Davies E.L., Lei K., Seidel C.W., Kroesen A.E., McKinney S.A., Guo L., Robb S.M.C., Ross E.J., Gotting K., Alvarado A.S. (2017) Embryonic origin of adult stem cells required for tissue homeostasis and regeneration. *Elife.* **6**, e21052.
<https://doi.org/10.7554/eLife.21052>
 32. England C., Emily E., Weibo C. (2016) NanoLuc: a small luciferase is brightening up the field of bioluminescence. *Physiol. Behav.* **27**, 1175–1187.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00112>. NanoLuc
 33. Vara D.C., Leal-Zanchet A.M., Lizardo-Daudt H.M. (2008) Embryonic development of *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). *Brazilian J. Biol.* **68**, 889–895.
<https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000400027>

34. Grudniewska M., Mouton S., Simanov D., et al. (2016) Transcriptional signatures of somatic neoblasts and germline cells in *Macrostomum lignano*. *Elife*. **5**, e20607. <https://doi.org/10.7554/eLife.20607>
35. De Mulder K., Kuaes G., Pfister D., Egger B., Seppi T., Eichberger P., Borgonie G., Ladurner P. (2010) Potential of *Macrostomum lignano* to recover from γ -ray irradiation. *Cell Tissue Res*. **339**, 527–542. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0915-6>
36. Wudarski J., Ustyantsev K., Reinoite F., Berezikov E. (2022) Random integration transgenesis in a free-living regenerative flatworm *Macrostomum lignano*. In: *Whole-Body Regeneration: Methods and Protocols*. Eds. Blanchoud S., Galliot B. New York: Springer US, pp. 493–508.
37. Ustyantsev K., Wudarski J., Sukhikh I., Reinoite F., Mouton S., Berezikov E. (2021) Proof of principle for piggyBac-mediated transgenesis in the flatworm *Macrostomum lignano*. *Genetics*. **218**(3), iyab076. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAB076>
38. Wudarski J., Egger B., Ramm S.A., Schärer L., Ladurner P., Zadesenets K.S., Rubtsov N.B., Mouton S., Berezikov E. (2020) The free-living flatworm *Macrostomum lignano*. *Evodevo*. **11**, 5. <https://doi.org/10.1186/s13227-020-00150-1>
39. Mouton S., Wudarski J., Grudniewska M., Berezikov E. (2018) The regenerative flatworm *Macrostomum lignano*, a model organism with high experimental potential. *Int. J. Dev. Biol.* **62**, 551–558. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180077eb>
40. Zadesenets K.S., Ershov N.I., Berezikov E., Rubtsov N.B. (2017) Chromosome evolution in the free-living flatworms: first evidence of intrachromosomal rearrangements in karyotype evolution of *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Macrostomida). *Genes* (Basel). **8**(11), 298. <https://doi.org/10.3390/genes8110298>
41. Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A., Konopatskaia I.D., Berezikov E., Schärer L., Rubtsov N.B. (2016) Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One*. **11**(10), e0164915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164915>

Transgenesis in Worms: Candidates for an Ideal Model

I. S. Sukhikh¹, *, M. Y. Biryukov¹, and A. G. Blinov¹, **

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: igor3419@gmail.com*

***e-mail: blinov@bionet.nsc.ru*

Transgenesis is an important and often irreplaceable method for studying of multiple processes of animal life. In order to create animal transgenic lines a fitting model organism, which would have necessary traits for effective and affordable transgenesis, is needed. This concise review is about characterization of existing model organisms of different taxa for which an effective method for transgenesis have been shown. Special attention is paid to flatworms, *Macrostomum lignano* in particular, as a promising model organism for studying aging, regeneration and cancerogenesis.

Keywords: flatworms, *Macrostomum lignano*, transgenesis, model organisms, transposons

УДК 575.113:575.155:575.224.22:576.5:615.5

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ В ТЕРАПИИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ

© 2022 г. А. В. Иваненко^а, Н. А. Евтушенко^а, Н. Г. Гурская*

^а Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117998 Россия

*e-mail: ngurskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 05.04.2022 г.

После доработки 12.05.2022 г.

Принята к публикации 13.05.2022 г.

В представленном обзоре рассмотрены перспективы использования новых подходов к терапии генодерматозов и методы коррекции этих наследственных заболеваний кожи. Большое число генотерапевтических методов применено в попытках коррекции или терапии заболеваний группы врожденного буллезного эпидермолиза. Замещение поврежденного гена с использованием вирусных и невирусных методов доставки сменилось редактированием генома с помощью программируемых нуклеаз. Основное внимание уделено широко используемым методам, применяемым *in vitro* на клетках различного типа. Выбор стратегии редактирования зависит от типа мутации, вызывающей заболевание, характера ее наследования и нуклеотидного окружения мутации. Рассмотрены модели заболеваний на животных, полученные с помощью редактирования генома. Суммирован опыт разработки методов редактирования генома и их применения в терапии генодерматозов, признанных ранее неизлечимыми.

Ключевые слова: генодерматоз, врожденный буллезный эпидермолиз, доминантная мутация, рецессивная мутация, эпидермальные кератиноциты, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, программируемая нуклеаза, редактирование генома, репарация, рекомбинация, трансгенные клетки, генотерапия, трансплантация

DOI: 10.31857/S0026898422060118

ВВЕДЕНИЕ

Методы генной терапии генодерматозов – наследственных заболеваний кожи, условно можно подразделить на методы, используемые *in vivo* (группа 1) и *in vitro* (группа 2). Кожа – это один из органов, наиболее перспективных для осуществления генетических манипуляций, поскольку это наружный орган, клетки которого доступны для генных пушек, наночастиц, микроигл и кремов, содержащих генотерапевтические кассеты. Перечисленные методы относятся к методам первой группы. Расширенное использование методов второй группы определяется простотой получения биопсийного материала кожи, возможно-

стью выделять клетки из малых количеств биоматериала, относительной легкостью поддержания клеток в условиях культуры [1]. Важна также “доступность” клеток для трансфекции и вирусной трансдукции, эффективность которых зависит от способов доставки генетического материала.

Выращенные *in vitro* пласты трансгенных клеток кожи (эпидермальных кератиноцитов и фибробластов), называемые трансгенными графтами, можно вернуть (трансплантировать) тому же пациенту. Успех аутологичной трансплантации во многом зависит от количества стволовых клеток, подвергнутых генетической коррекции, природы генетического нарушения, а также от вовлеченности других органов и систем в патогенез исслеуемого заболевания. Технология замещения гена применяется в терапии генодерматозов относительно давно, достигая в ряде случаев устойчивых и долговременных терапевтических эффектов [2]. Показано, что при замещении гена с помощью вирусной трансдукции опасность развития онкологических изменений в коже ниже, чем в клетках крови, кроме того, на коже легче раньше выявить новообразование [3]. Кратко пе-

Сокращения: БЭ – буллезный эпидермолиз; ВБЭ – врожденный буллезный эпидермолиз; ДЭБ – дистрофический БЭ; БЭП – простой БЭ; ДДБЭ – доминантный дистрофический БЭ; РДБЭ – рецессивный дистрофический БЭ; ПоБЭ – пограничная форма БЭ; *KRT* – гены кератинов; *COL7A1* – ген α -1-цепи коллагена типа VII; *C7* – α -цепь коллагена VII; ДЦР – двухпочечный разрыв; HR – гомологичная рекомбинация; HDR – направленная гомологичная рекомбинация; с-NHEJ – канонический путь негомологичного соединения концов; иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

речислим другие факторы, ограничивающие использование вирусных векторов в генотерапии. Во-первых, сильные нерегулируемые вирусные промоторы искажают регуляцию экспрессии гена, которая в клетках в норме изменяется в зависимости от дифференцировочного статуса и межклеточных взаимодействий; во-вторых, случайная интеграция провируса в геном требует дополнительной проверки трансгенных линий клеток для исключения возможных онкотрансформаций; в-третьих, вероятность метилирования промоторов, а, следовательно, постепенное “замалчивание” экспрессии и, наконец, сложность доставки фрагментов большой длины (например, длина кодирующей области генов *COL7A1* и *PLEC* составляет около 9 и 14 т.п.н. соответственно). Все эти факторы не позволяют рассматривать метод замещения гена как приоритетный, особенно при сравнении с быстро развивающимися стратегиями направленного редактирования генома.

С редактированием геномов с помощью программируемых нуклеаз связано наибольшее количество методов и технологий. Важными преимуществами геномного редактирования является сохранение эндогенной регуляции экспрессии редактируемого гена, что определяет паттерн экспрессии и дифференцировки клеток, отсутствие трансгенных последовательностей в геноме, а также возможность редактирования популяций стволовых клеток и их репрограммирования с целью получения клеток разного типа. Одной из первых групп генодерматозов, к которым начали применять новые методы генотерапии и редактирования геномов, стала группа орфанного заболевания – врожденного буллезного эпидермолиза (ВБЭ). К настоящему моменту к ВБЭ применены почти все основные варианты редактирования генома с использованием TALEN-доменов, системы CRISPR/Cas9, сначала на первичных пациент-специфичных клетках, а затем и с использованием стволовых клеток. Например, компания “CRISPR THERAPEUTICS AG” США запатентовала (патент WO/2018/154413) редактирование генома при дистрофическом буллезном эпидермолизе (ДЭБ) и других состояниях или заболеваниях, связанных с геном *COL7A1*, кодирующим α -1-цепь коллагена типа VII (С7) [4].

После редактирования генома и полноэкзомного секвенирования первичные клетки кожи пациентов (кератиноциты и фибробласты) могут использоваться для локализованной терапии – аутологичной трансплантации трансгенного клеточного продукта, полученного при соблюдении правил надлежащей производственной практики (GMP) и проведения доклинических испытаний на животных [5, 6]. После этого за пациентом наблюдают в течение длительного времени, анализируют состояние кожи в зонах трансплантации и динамику восстановления экспрессии целевых

белков в местах поражений. Есть сообщения о снижении клинических проявлений заболевания в первые 3–6 месяцев после успешной трансплантации, но затем состояние пациентов ухудшалось [6].

Пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), получаемые из первичных клеток, могут использоваться для редактирования генома и получения изогенных клеток различного типа, не только фибробластов и эпидермальных кератиноцитов, но также гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток. Использование полученных из иПСК клеток в аутологичных трансплантациях имеет ряд ограничений, связанных с возможным риском злокачественного перерождения, обусловленного не полным репрограммированием иПСК. Тем не менее, использование иПСК имеет огромное значение для изучения перспектив применения генной и клеточной терапии при ВБЭ. Возможность редактирования генома стволовых клеток важна для создания уникальной популяции возобновляемых изогенных пациент-специфичных клеток без патологической мутации.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОДЕРМАТОЗОВ

Генодерматозы – гетерогенная группа наследственных, в основном моногенных, заболеваний кожи, различающихся характером повреждений, уровнем их образования в коже и характером наследования мутаций. Мы сфокусируем внимание на генодерматозах с герминативными мутациями, оставляя широкую группу других многофакторных заболеваний (псориаз, атопический дерматит и нейродермит) вне рассмотрения. К генодерматозам относятся более 200 различных заболеваний, в пределах которых по фенотипическим проявлениям выделяют отдельные группы: (1) заболевания, приводящие к нарушениям ороговения (ихтиозы, кератозы и кератодермии); (2) заболевания, при которых нарушена пигментация (гипо- и гиперпигментация); (3) заболевания, обусловленные дефектами в системе репарации ДНК (пигментная ксеродерма, синдром Вернера); (4) буллезные генодерматозы (группа ВБЭ); и (5) генодерматозы соединительной ткани.

Установлены корреляции между генотипом многих генодерматозов и фенотипическими и клиническими проявлениями заболевания (рис. 1). С мутациями кератинов, обширного семейства белков, образующих промежуточные филаменты, связаны нарушения прочности, пролиферации и дифференцировки эпидермиса. В зависимости от гена, мутации в котором вызывают заболевание, и локализации мутации возможно образование внутриклеточных агрегатов тонофиламентов и нарушение связи тонофиламентов с десмосома-

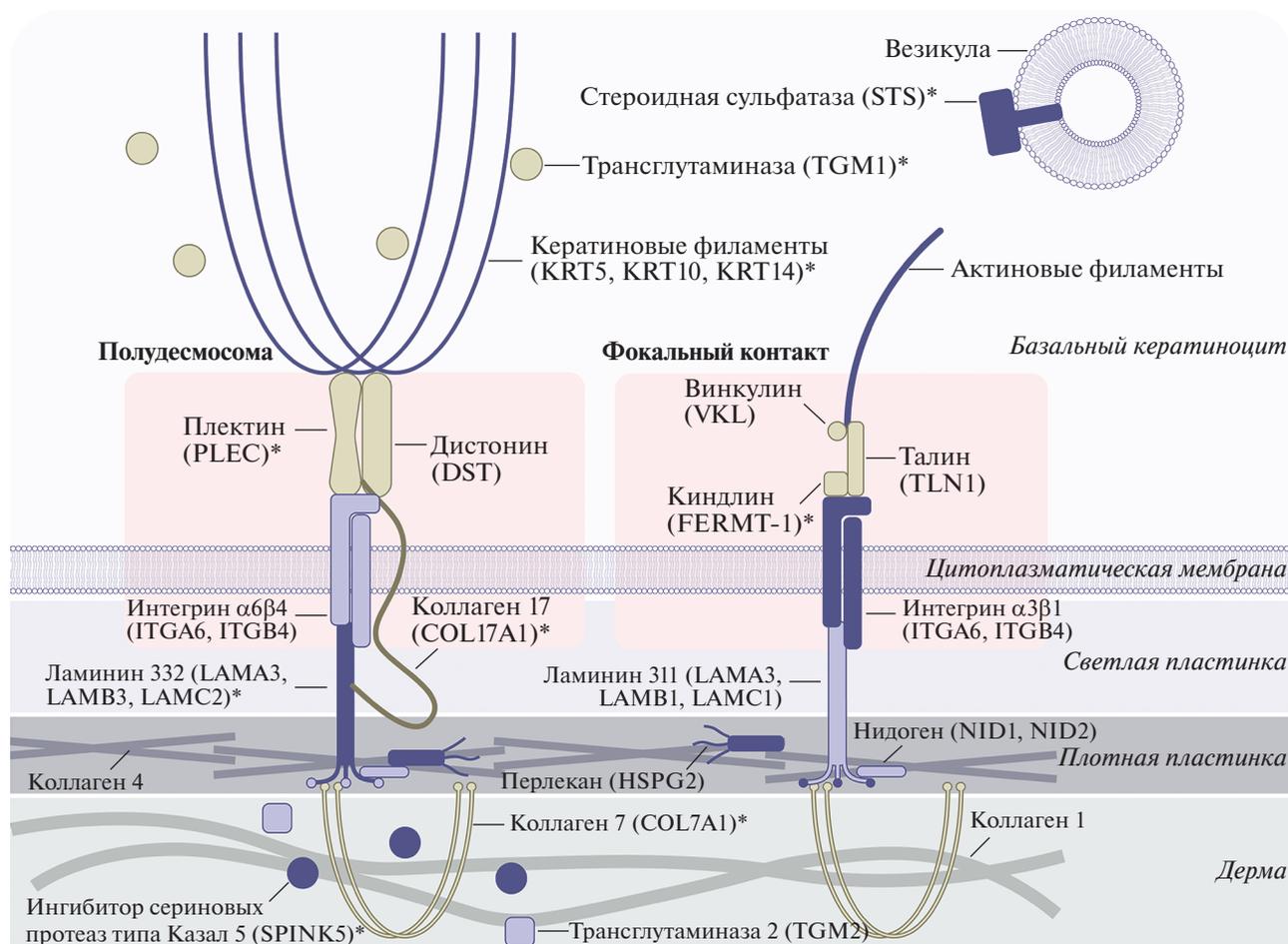


Рис. 1. Схема кератиноцита базального слоя эпидермиса и внеклеточного матрикса с указанием белков, нарушения функций которых вызывают генодерматозы. Причиной генодерматозов являются мутации в генах, кодирующих белки кожи. Чаще всего это структурные белки либо взаимодействующие с ними белки. Звездочками обозначены белки, к генам которых применены методы генотерапии.

ми [1, 7]. Нарушения функции плектина (PLEC, важный линкерный белок, обеспечивающий связь промежуточных филаментов с полудесмосомами) приводят к возникновению синдромных форм поясно-конечностной мышечной дистрофии. Нарушения экспрессии плектина или трансмембранного белка $\alpha\beta4$ -интегрин (ITGA6, ITGB4) приводят к развитию синдромной формы БЭ с врожденной атрезией привратника. При генодерматозах возможны нарушения пигментации кожи, страдает эпителий слизистых оболочек, кожные придатки. За соединение базального слоя эпидермиса с дермой отвечает зона базальной мембраны. Нарушение белков зоны базальной мембраны, например, гетеротримерного ламинина 332 и COL17A1, приводит к разобщению плазматической мембраны базальных кератиноцитов и базальной мембраны, поражению базальной мембраны в области *lamina lucida*. Наконец, нарушения в самом нижнем слое кожи (коллаген

VII) затрагивают зону дермоэпидермального соединения под *lamina densa*.

ВБЭ относится именно к такой сильно гетерогенной группе генодерматозов, объединенных таким свойством, как хрупкость кожи. Эффективные лекарства от ВБЭ в настоящее время отсутствуют, в клинике активно применяются методы паллиативной медицины – средства местного воздействия, направленные на заживление эрозий и язв со смягчающим и защитным действием, а также противовоспалительные средства [7]. Наблюдения клиницистов-дерматологов свидетельствуют о более легком течении болезни при локализованной форме простого (БЭП) или при доминантном дистрофическом ВБЭ (ДДБЭ) [7–9]. Больные с пограничной формой (ПоБЭ), тяжелой генерализованной формой БЭП и рецессивным дистрофическим ВБЭ (РДБЭ) испытывают постоянную боль и зуд в коже, в ответ на минимальную внешнюю нагрузку появляются волдыри и эрозии, которые имеют распространенный

характер. Однако клинические проявления ВБЭ в пределах группы сильно различаются. Локализация поражений в коже зависит от расположения в ней измененного белка (рис. 1). Известно четыре основных группы ВБЭ, три из которых выделяют в зависимости от уровня расщеплений в коже: БЭП проявляется в базальном слое эпидермиса, ПоБЭ – в зоне базальной мембраны, ДБЭ – на уровне якорных фибрилл, связывающих дерму с эпидермисом. На тяжесть клинических проявлений влияет положение мутации в гене, при этом на клинические проявления и течение БЭП и ПоБЭ влияет то, в каком гене произошла мутация [8]. При большом разнообразии мутаций, вызывающих конкретные наследственные заболевания кожи, важным представляется выявление корреляции между генотипом и клиническими особенностями заболевания [10].

Из 560 уникальных генодерматозов (имеющих уникальную запись OMIM) 543 связаны с известными белками (с идентификационным номером (GI, GenInfo Identifier)); остальные 17 связаны с локусами, кодирующими белки с неустановленными GI. Около 85% генодерматозов относятся к моногенным заболеваниям, в основе 9% лежат нарушения в двух генах, а примерно 4% содержат мутации в трех и более разных генах [10]. По данным этих исследований среди всех генодерматозов с установленным наследованием 46% являются аутосомно-рецессивными, а 37% имеют аутосомно-доминантный характер. Ассоциированные с X-хромосомой рецессивно и доминантно наследуемые генодерматозы составляют 4.2 и 1.9% всех генодерматозов соответственно.

ДИАГНОСТИКА ГЕНОДЕРМАТОЗОВ

Генодерматозы диагностируют с помощью иммуногистохимических методов (антигенное картирование) [11, 12]. Более полный анализ патоморфологических изменений и определение их локализации проводят с помощью просвечивающей электронной микроскопии срезов биоптатов кожи [13, 14]. Для патогистологической характеристики можно использовать методы нелинейной оптической микроскопии [15].

Например, применение метода генерации второй гармоники (от англ. Second-Harmonic Generation) и двухфотонного возбуждения флуоресценции (от англ. Two-Photon absorption Fluorescence) позволило выявить нарушения при эпидермолитическом ихтиозе [16]. Такой анализ основан на выявлении структурных изменений коллагенов и кератинов, что позволяет проводить точную диагностику. Определить тип ВБЭ помогает изучение ультраструктуры областей дермоэпидермального соединения, зоны светлой пластинки базальной мембраны, гемидесмосом и других особенностей эпидермиса с помощью просвечи-

вающей электронной микроскопии. В биоптатах кожи пациентов с ВБЭ определенные структуры (якорные фибриллы или компоненты базальной мембраны) либо не детектируются, либо их количество снижено, что приводит к расщеплению слоев, образованию пузырей и эрозий в различных слоях кожи в зависимости от типа ВБЭ [8]. В связи с быстрым развитием технологий высокопроизводительного секвенирования диагностика ВБЭ также переходит постепенно на платформы полноэкзомного секвенирования и секвенирования генов из группы риска, которых в настоящее время насчитывается чуть более 20 [17].

ДОМИНАНТНО И РЕЦЕССИВНО НАСЛЕДУЕМЫЕ МУТАЦИИ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТНЫЕ ПАТОЛОГИИ ГЕНОДЕРМАТОЗОВ

Кратко рассмотрим типы наследования патологических мутаций, вызывающих генодерматозы.

1. Среди доминантно-негативных мутаций наиболее распространены мутации, вызывающие кератинопатию. К кератинопатиям относится группа заболеваний, включающая ВБЭ простого типа (БЭП), эпидермолитический ихтиоз, врожденная пахионихия, при которых нарушаются функции кератинов, экспрессирующихся специфически в разных эпидермальных слоях кожи. Аутосомно-доминантные мутации в генах *KRT5*, *KRT14*, *KRT1*, *KRT10*, *KRT6A*, *KRT6B*, *KRT6C*, *KRT16*, *KRT17* приводят к появлению того или иного генодерматоза, проявляющегося хрупкостью эпидермиса, появлением пузырей, цитолизом и гиперкератозом [18, 19]. Генотип пробанда может содержать гетерозиготные миссенс-мутации или небольшие инсерции и делеции, которые пациенты либо унаследовали от родителей по доминантному типу, либо приобрели *de novo*. Так, около 30% случаев врожденной пахионихии вызваны *de novo* мутациями [20].

2. Мутации аутосомно-доминантного типа обнаруживаются также при ДБЭ. Выделяют два типа ДБЭ: аутосомно-доминантный (ДДБЭ) и аутосомно-рецессивный БЭ (РДБЭ). По данным 2011 года РДБЭ встречается, в 4 раза чаще, чем ДДБЭ [21]. Оба типа ДБЭ возникают в результате мутаций в гене *COL7A1*, большая часть мутаций ДДБЭ – это миссенс-мутации в кодирующих глицин кодонах в повторяющихся триадах Gly-X-Y C7 [22].

3. ВБЭ пограничного типа (ПоБЭ) вызывается аутосомно-рецессивными мутациями. Наиболее тяжелую форму Герлица вызывают патологические мутации в гене *LAMB3*, кодирующем один из мономеров гетеротримерного белка ламинина 332, важного компонента комплекса белков базальной мембраны (рис. 1). Причиной ПоБЭ могут быть

также мутации в генах, кодирующих коллаген XVII (COL17) и $\alpha 6\beta 4$ -интегрины (ITGR $\alpha 6\beta 4$).

РДБЭ – наиболее сложный инвалидизирующий подтип ВБЭ, при котором затронуты не только кожные покровы, но и эпителиальная выстилка внутренних органов, во многих тканях развиваются фибротические изменения, страдает зрение, отмечается ранняя смертность вследствие развития плоскоклеточного рака кожи. При РДБЭ находят миссенс-, нонсенс-мутации и мутации, нарушающие сплайсинг гена *COL7A1*. При РДБЭ возможно как снижение количества коллагена VII (C7), так и полное отсутствие этого белка [23]. В табл. 1 перечислены некоторые генодерматозы, указаны гены и патологические мутации, а также характер их наследования.

3. Среди всех патогенных мутаций в *COL7A1* (в нем насчитывают более 800 различных мутаций) примерно 34% занимают нонсенс-мутации, прерывающие рамку считывания *COL7A1* и приводящие к появлению преждевременных стоп-кодонов [35]. Преждевременные стоп-кодона появляются либо непосредственно (нонсенс-мутации), либо вследствие мутаций, нарушающих сплайсинг.

В клетках эукариот существует специальный механизм деградации транскриптов с преждевременными стоп-кодонами (NMD, Nonsense Mediated Decay). Эффективность деградации зависит от локализации этих стоп-кодонов в экзоне и длины фрагмента между стоп-кодоном и ближайшим сайтом сплайсинга, т.е. местом соединения экзонов [36]. NMD является причиной функционального нарушения при многих известных генетических болезнях, так как деградация мРНК приводит к нехватке или отсутствию функционального белка [37]. При этом возможен и обратный вариант, при котором в результате NMD снижается количество частично функционального укороченного белка, как в случае мышечной дистрофии Дюшенна [38]. Встречаются и другие варианты с противоположным эффектом, когда отсутствие NMD приводит к синтезу укороченного и/или токсичного для клетки белка [37–39]. В этом случае активация каскада может привести к улучшению фенотипа. Суммируя, можно выделить группу заболеваний, при которых активация NMD приводит к ухудшению функциональных проявлений в клетках; и группу, в которой NMD снижает проявления патологической мутации [37].

Редактирование генома может привести к изменению рамки считывания мутантного аллеля, появлению NMD и потере доминантно-негативного эффекта мутации. Возможен противоположный вариант, когда патологическое действие мутации заключается в деградации по механизму NMD и потере функции, вызванной нехваткой белка. В результате редактирования деградация прекращается за счет изменения рамки считыва-

ния. Таким образом, возникновение NMD в результате мутации чаще имеет негативные последствия при рецессивно-наследуемых формах генодерматозов, тогда как снижение NMD может приводить к восстановлению функции гена. В случае доминантно-негативных мутаций манипулирование активацией NMD за счет встраивания инсерций и делеций (инделей) в мутантный аллель может восстановить поврежденную функцию в клетке.

МЕТОДЫ ТЕРАПИИ ГЕНОДЕРМАТОЗОВ И ИХ РАЗВИТИЕ

До появления методов геномного редактирования разрабатывались методы клеточной и генной терапии генодерматозов *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, описаны попытки посттранскрипционного воздействия на мРНК генов с известными мутациями, вызывающими генодерматозы: это прежде всего применение малых молекул, влияющих на эффективность трансляции мРНК с преждевременными стоп-кодонами, например, амплексанокса или гентамицина, воздействие на сплайсинг пре-мРНК с помощью антисмысловых олигонуклеотидов и использование механизма транс-сплайсинга [8, 39]. Однако необходимость постоянного введения в клетки терапевтического агента и относительно невысокая эффективность этих методов ограничивают их применение.

Развитие методов генетической коррекции и клеточной терапии генодерматозов

В начале 2000 годов начались поиски подходов к генетической коррекции генодерматозов, прежде всего мутаций гена *COL7A1*, без использования вирусных платформ доставки, с помощью интеграции космидных ДНК, микроинъекций плазмид РАС (на основе искусственных хромосом из Р1) в культуры клеток пациентов с РДБЭ и в трансгенных мышей [40, 41]. Затем в развитии генных и клеточных технологий все большее место стали занимать вирусные методы доставки. При некоторых наследственных заболеваниях кожи успешно применяли вирусную трансдукцию генотерапевтическими кассетами. Это, прежде всего, пигментная ксеродерма [26, 27], врожденный ихтиоз, ассоциированный с X-хромосомой [24], синдром Нидертона [42], ПоБЭ [25, 33] и РДБЭ [5, 43, 44] (табл. 1). Как правило, использовали ретровирусные системы доставки генотерапевтической кассеты [45], но применяли также векторы на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), например, в случае *LAMA3* [46] и *SPINK5* [47] (рис. 1). Доставка трансгенных последовательностей с помощью векторов на основе AAV оказалась очень эффективной, но ограниченный размер вставки, встраиваемой при использовании таких векто-

Таблица 1. Генодерматозы, их фенотипические проявления и генетические основы, методы генетической коррекции

| Генодерматоз | Фенотипические проявления | Характер наследуемости | Ген | Метод редактирования | OMIM | Ссылка |
|--|--|------------------------|---|---|---------|----------|
| Х-ассоциированный ихтиоз | Нарушения процессов ороговения; нарушения обмена стероидов | ХР | STS | Ретровирусная генотерапия | 308 100 | [24] |
| Эпидермолитический ихтиоз | Акантокератолитический гиперкератоз** | АД | KRT10 | Нокаут гена | 607 602 | [25] |
| Пигментная ксеродерма | Нарушения пигментации сопровождаются патологическим ороговением, атрофией, дистрофией ткани, атипией и ранним развитием опухолей | АР | XPC | Ретровирусная генотерапия | 278 720 | [26, 27] |
| Врожденный ламеллярный ихтиоз | Гиперкератоз, гиперплазия базального слоя эпидермиса | АР | TGM1 | Редакторы оснований | 242 300 | [28] |
| Синдром Нидертон* | Нарушение ороговения в эпидермисе; аллергия, нарушения иммунной системы | АР | SPINK5 | Нокаут гена CRISPR/Cas9 HDR | 256 500 | [29] |
| Врожденный буллезный эпидермолиз | | | | | | |
| Буллезный эпидермолиз простого типа | Пузыри в базальном слое эпидермиса не оставляют рубцов, при стрессе клеток происходит агрегация цитокератиновой сети | АД | KRT14, KRT5 | CRISPR/Cas9 HR; TALEN HDR | 131 900 | [30–32] |
| Буллезный эпидермолиз пограничного типа | Появление пузырей и эрозий без травм, образование грануляционной ткани | АР | COL17 LAMA3 LAMB3 LAMC2 ITGA6, ITGB4 | Ретровирусная генотерапия; CRISPR/Cas9 HR | 226 650 | [33] |
| Буллезный эпидермолиз дистрофического типа | Пузыри и эрозии глубокого залегания в коже, заживают атрофическими рубцами, милии, сращения, образование агрессивных карцином | АР АД | COL7A1 | CRISPR/Cas9 HR; CRISPR/Cas9 HDR TALEN HR | 226 600 | [34] |
| Синдром Киндлер | Пузыри и рубцевание с формированием контрактур, псевдосиндактилии | АР | FERMT1 | Нет | 173 650 | [7] |

* Термин синдром подразумевает мультиорганную патофизиологию, т.е. наличие иных, не только кожных повреждений.

** Гиперкератоз акантолитический – нарушение дифференцировки кератиноцитов, приводящее к вакуолизации, утолщению и образованию пузырей в верхнем слое эпидермиса.

Примечание. АД – аутосомно доминантный; АР – аутосомно рецессивный; ХР – ассоциированный с Х-хромосомой, рецессивный.

ров, делает этот метод недоступным для ряда генов. Основной популяцией клеток при редактировании упомянутых выше генов были эпидермальные кератиноциты (для *ex vivo* протоколов терапии). Оказалось, что для достижения длительного терапевтического эффекта от примене-

ния генной терапии важна не только эффективная трансдукция клеток, но и оптимальные условия культивирования первичных кератиноцитов. Среди первичных кератиноцитов базального слоя эпидермиса есть стволовые эпидермальные кератиноциты, так называемые голо-клоны [33]. Гене-

тическая модификация именно этой популяции обеспечивает длительное действие трансгенного эпидермиса после аутологичной трансплантации. Если культивируемые клетки подверглись стрессу и/или репликативному старению, то приготовленные на их основе графты не окажут терапевтического эффекта [31].

Для клеточной терапии РДБЭ используют дермальные фибробласты и эпидермальные кератиноциты, поскольку и фибробласты, и кератиноциты секретируют С7. Аутологичная трансплантация в большинстве случаев приводит к временному повышению содержания С7 в коже в области дермо-эпидермального соединения. Однако временный и местный характер терапии и риск осложнений от аллогенной трансплантации делают необходимым поиск других подходов. Так, в течение нескольких лет проходят клинические исследования эффективности интрадермальных инъекций ген-модифицированных аутологичных фибробластов у пациентов с РДБЭ (NCT02493816) [48]. Опубликованы результаты клинических исследований и 5-летнего наблюдения ребенка с тяжелой формой ПоБЭ, перенесшего аутологичную трансплантацию трансгенного эпидермиса [2, 33]. Наибольшее количество методов генотерапии заболеваний кожи предполагает проведение генетической коррекции *ex vivo* на пациент-специфичных кератиноцитах, фибробластах и стволовых клетках [34, 49, 50]. Протоколы генетической коррекции *ex vivo* включают несколько стадий: культивирование клеток, выделенных из образцов ткани, полученных при биопсии; проведение генетической коррекции (вирусная трансдукция; редактирование геномов с помощью программируемых нуклеаз); наращивание генетически модифицированных клеток по безопасным протоколам GMP; обширный анализ и проверка функциональной безопасности редактирования; ксенотрансплантация клеток мышам с иммунодефицитом и оценка экспрессии маркеров дифференцировки; трансплантация клеточных пластов (графтов) пациенту. Альтернативно развивается стратегия генетической коррекции *in vivo*, когда пациенту интрадермально вводят суспензию вирусных частиц с функциональной копией гена. К методам генотерапии, применяемым *in vivo*, относятся электропорация и внутривенное введение системы CRISPR/Cas9, которые в настоящее время применяют только в доклинических исследованиях [51]. Недавно американская компания “Krystal Biotech” запатентовала для *in vivo* применения новое генотерапевтическое средство В-VEC на основе рекомбинантного вируса простого герпеса (HSV1), содержащего две копии кодирующей области гена *COL7A1*. Начались клинические испытания (фазы 1 и 2) препарата В-VEC на пациентах с РДБЭ [52]. В-VEC применили, в частности, в терапии нарушений роговицы у больных с РДБЭ

[4]. Учитывая мультисистемный характер нарушений при целом ряде генодерматозов, разработка новых методов терапии и совершенствование методов доставки терапевтических агентов приобретает особое значение в случае заболеваний, считавшихся неизлечимыми.

Обратный мозаицизм

В процессе изучения ВБЭ обнаружили феномен, названный обратным мозаицизмом. На коже пациента впервые были найдены зоны самопроизвольного восстановления целостности эпидермиса, которые оказались результатом возникновения в этих зонах второй мутации, компенсирующей воздействие первой патологической мутации. Обратный мозаицизм обнаружен при всех формах ВБЭ, за исключением синдрома Киндлер [53, 54]. Сообщается о нескольких зонах, содержащих до пяти различных мутаций разных локализаций, на теле пациентов с ВБЭ [55]. Обратный мозаицизм найден примерно у 36% пациентов с РДБЭ. Кроме того, у пациентов с РДБЭ обнаружены дермальные фибробласты с обратным мозаицизмом [56]. Впервые появились перспективы аутологичной трансплантации: первичные клетки из зон с мозаицизмом, культивируемые *in vitro*, рассматривали как биомедицинский продукт, перспективный для аутологичной трансплантации. Результаты применения этого подхода оказались весьма скромными и, если в случае ПоБЭ они улучшили состояние пациентов, то при РДБЭ эффект полностью отсутствовал. Терапевтический потенциал клеток из зон с обратным мозаицизмом оказался ограниченным, по-видимому, за счет снижения пролиферативной активности мозаичных клеток. Получение иПСК из кератиноцитов из зон мозаицизма, например при РДБЭ, стало одним из первых перспективных методов персонализированной медицины, получивших развитие до начала широкого применения методов редактирования генома [57].

Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток

Наравне с редактированием генома разрабатывается альтернативный терапевтический подход — аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток костного мозга от донора, полностью совместимого по HLA (Human Leukocyte Antigens). Показано, что мезенхимальные стволовые клетки костного мозга направленно мигрируют в зоны воспаления на коже [58]. В частности, после успешного доклинического испытания ксенотрансплантации на мышах начались клинические испытания такого подхода к терапии ВБЭ и РДБЭ, как наиболее тяжелой формы ВБЭ [59]. В настоящее время совершенствуется использование алло-

генной трансплантации гемопоэтических клеток костного мозга и мезенхимальных стволовых клеток пациентам с РДБЭ после проведения химиотерапии [60, 61]. Отмечены смертельные исходы, обусловленные развитием иммунной реакции трансплантат против хозяина и высокой токсичностью проводимой химиотерапии. Сообщается об успешных клинических испытаниях (NCT02582775) на 10 пациентах, которым проводили аллогенную трансплантацию мезенхимальных стволовых клеток в сочетании с введением циклофосфида для обеспечения иммунной толерантности [62, 63]. Сочетание методов аллогенной трансплантации с редактированием генома может создать реальную перспективу терапии этого сложного генетического заболевания.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки и их репрограммирование в клетки разных типов

Развитие технологии получения iPСК из пациент-специфичных клеток увеличило возможности и перспективы новых методов функциональной терапии [64]. Разработка протоколов “дифференцировки” iPСК, т.е. их репрограммирование в клетки разного типа, имеет принципиальное значение. Естественный репликативный предел первичных соматических клеток (предел Хейфлика) ограничивает возможности их использования после генетической коррекции. Особенно это касается тех случаев, когда биоптат пациента содержит мало эпидермальных стволовых клеток, как бывает, например, при РДБЭ. Получение изогенных iPСК и редактирование генома с последующим репрограммированием в изогенные клетки, фибробласты, кератиноциты и гемопоэтические клетки потенциально позволяет убрать эти ограничения. Методы репрограммирования в разные типы клеток не всегда просты, но постоянно совершенствуются [65]. Перспектива использования iPСК для редактирования генома подчеркивается в контексте генотерапии ВБЭ, особенно дистрофического типа при РДБЭ [34, 66]. Синдромные проявления генодерматоза или наличие тяжелых генерализованных форм, когда страдают не только кожа, но и слизистые оболочки внутренних органов, а также роговица и конъюнктивы глаз, диктуют необходимость генотерапевтического подхода на уровне стволовых клеток. В 2011 году были опубликованы результаты первого опыта прямого репрограммирования iPСК, специфичных для РДБЭ, в кератиноциты и фибробласты [67]. В этой работе впервые для ВБЭ получены 3D модели эпидермиса и искусственные эквиваленты кожи, содержащие кератиноциты и фибробласты, репрограммированные из iPСК. После ксенотрансплантации искусственных эквивалентов кожи мышам SCID/NOD и за-

растания раны проводили иммуногистохимический анализ маркеров экспрессии. С помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа выявили различия в уровне экспрессии секреторного белка С7 в эквивалентах, несущих РДБЭ-специфичные клетки, и в образцах клеток, полученных от здоровых доноров. Предшественник белка С7 подвергается посттрансляционным модификациям, отщеплению N- и C-концевых частей, антипараллельной димеризации, а потом тримеризации. В результате этих модификаций образуются отдельные морфологические структуры – якорные фибриллы, связывающие дерму с эпидермисом. Якорные фибриллы хорошо детектируются с помощью трансмиссионной электронной микроскопии [63]. При РДБЭ мутации в гене *COL7A1*, кодирующем С7, приводят к дефициту или полному отсутствию якорных фибрилл. Таким же способом с помощью функционального иммуногистохимического анализа оценивают эффективность восстановления экспрессии целевого гена в клетках после редактирования генома.

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА

Пути репарации внесенных в ДНК одноцепочечных и двухцепочечных разрывов

Методология редактирования генома тесно связана с выбором и активацией пути репарации ДНК после внесения в нее разрывов программируемыми нуклеазами. Выявление ключевых факторов, регулирующих репарацию, важно для понимания механизмов процесса и возможности манипулировать ими по ходу редактирования генома.

Одноцепочечные разрывы возникают в клетке постоянно, их быстрая репарация, превращение в двухцепочечные (ДЦР) и процессирование регулирует репликативный стресс клетки, предотвращает ее преждевременное старение и гибель, а также блокирует возможную онкотрансформацию. В клетках млекопитающих существуют два основных пути репарации разрывов ДНК: канонический путь негомологичного соединения концов (с-NHEJ, от англ. canonical nonhomology end-joining) и направляемая гомологией репарация (HDR). HDR происходит путем гомологичной рекомбинации с участием другой молекулы ДНК. Важную роль в репарации ДНК играют киназы, подобные фосфатидилинозитол-3-киназам (ATM, ATR, DNA-PKcs) [68]. Помимо репарации, в которой ключевая роль отводится ATM и DNA-PK, все три киназы участвуют в регуляции клеточного цикла, в частности, ATM активирует киназы контрольных точек репликации (check point kinases). ATM вовлечена в регуляцию прохождения клеточного цикла, активация ATR приводит к репликативному стрессу и остановке клеточного

цикла [69]. Активность двух других треонин-сериновых протеинкиназ важна для репарации ДЦР: АТМ участвует в регуляции клеточного цикла, DNK-ПК – в регуляции репликативного стресса. Аутофосфорилирование каталитической субъединицы DNA-ПК, происходящее в области повреждения ДНК в присутствии Ku-полимераз, приводит к активации всего холофермента, стимулирующего активность эндонуклеазы Artemis к процессированию разрывов ДНК [70]. Показано, что аутофосфорилирование DNA-ПК запускает с-NHEJ [69]. Для правильного прохождения репарации важен процесс фосфорилирования гистона γ H2AX и белка-медиатора контрольной точки репликации 1 (MDK1). Последующая активация и привлечение E3 убиквитинлигаз к гистону H2A создают в области ДЦР удобную платформу для привлечения факторов, участвующих в каскадах, идущих по пути, опосредованному либо 53BP1, либо BRCA1. В HDR участвуют 53BP1, полимеразы Ku и ДНК-лигаза 4, которая напрямую лигирует два конца ДНК [71]. Путь с-NHEJ наиболее активен в основных фазах клеточного цикла (кроме S и частично G2). Благодаря активности с-NHEJ происходит образование инсерций и делеций в сайте специфического разрезания при редактировании генома. На линиях клеток человека с помощью интеграции флуоресцентных репортеров в хромосомы показано, что с-NHEJ активируется через 30 мин после образования разрывов в ДНК и отвечает за 75% всех репаративных процессов [72].

Баланс активности и содержания ряда регуляторных факторов, киназ, ДНК-связывающих белков, нуклеаз и полимераз определяет, по какому пути пойдет репарация в клетке, например, активность комплекса MRN (MRE11-RAD50-NBS1), за активацию которого отвечает комплекс Sae2/CtIP, сдвигает равновесие в сторону гомологичной рекомбинации [73]. Баланс факторов CtIP и MRE11 влияет на эффективность процесса резекции концов ДНК в области ДЦР. Защита ДЦР, регулируемая при поддержке факторов WRN и RECQ, позволяет клетке избежать возникновения больших делеций и слипания концов хромосом [74]. Для начала гомологичной рекомбинации важен процесс резекции 5'-концов, т.е. образование одноцепочечных 3'-концов, субстратов RAD51. Для резекции концов после первой стадии активации комплекса MRN важна вторая стадия – получение 3'-выступающих концов, протекающая за счет активации экзонуклеаз Exo1 и Dna2. HDR, в отличие от всех остальных процессов, это единственный механизм, обеспечивающий точное восстановление репарированной матрицы. Важным фактором, обеспечивающим сохранение исходной последовательности в ДНК, является встраивание гомологичной ДНК, используемой в качестве матрицы, это может

быть сестринская хроматида или экзогенная донорная ДНК [72]. Для процесса HDR важна активность таких факторов, как BRCA2, PALB2 и RAD51, и снижение активности 53BP1. Негативная роль 53BP1 в HDR подтверждается тем, что доминантно-негативный мутант 53BP, слитый с белком Cas9, снижает с-NHEJ и увеличивает эффективность HDR в клетках различного типа [75]. Использование механизмов HDR позволяет исправлять точечные мутации и вводить более длинные последовательности, например, флуоресцентные репортеры или гены устойчивости к антибиотикам. При редактировании геномов часто используется подход, связанный с введением в рекомбинантные донорные последовательности loxP-повторов, позволяющих проводить отбор прошедших рекомбинацию клонов, а затем с помощью сайт-направленной Cre-рекомбинации элиминировать из генома экзогенные кассеты [34, 76].

Программируемые нуклеазы

В генотерапии с применением редактирования генома используются в основном программируемые нуклеазы на основе открытых ранее доменов TALEN и систем CRISPR/Cas (применяемых в настоящее время). TALEN – это химерные белки, которые состоят из нуклеазного домена FokI и ДНК-связывающего TALE-домена – транскрипционного фактора, полученного из растительного патогена *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен состоит из tandemно расположенных повторов из 35 аминокислотных остатков, при этом каждый повтор узнает только один нуклеотид в большой бороздке ДНК. Таким образом набор TALE-доменов узнает уникальную последовательность ДНК длиной 20 п.н. Эта синтетическая система способна специфически узнавать любую последовательность ДНК. До изобретения системы CRISPR/Cas9 основные надежды на развитие методов редактирования геномов связывали с доменами TALEN. К недостаткам TALEN-доменов следует отнести трудоемкость и сложность их клонирования. При необходимости изменения последовательности для редактирования нужно полностью изменить дизайн TALE и клонировать *de novo* всю химерную молекулу TALEN.

В отличие от белков TALEN действие системы CRISPR/Cas направляется некодирующей РНК. CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами и разделенные уникальными последовательностями (спейсерами). Специфичность разрезания чужеродной ДНК нуклеазой Cas определяется короткими некодирующими РНК, узнающими и связывающими последовательность ДНК-мишени. В названии CRISPR/Cas отражено прокариотическое

происхождение этой системы, являющейся частью иммунной системы прокариот. Самое широкое применение на сегодня имеет белок Cas9 (или spCas9, выделенный из *Streptococcus pyogenes*), CRISPR/Cas9 относится ко второму типу систем, в которых участки CRISPR процессируются и в соединении с транс-активирующей РНК crRNA (tracrRNA) образуют так называемую направляющую РНК (sgRNA, англ. single guide RNA), которая комплементарно связывается с целевым фрагментом ДНК, узнавая таким образом ДНК-мишень. Связавшись с ДНК, эти РНК взаимодействуют с Cas9, конформация которой изменяется, после чего фермент начинает специфично вносить ДЦР в ДНК [77]. Для функционирования системы необходим трехнуклеотидный PAM-мотив в ДНК (PAM – Protospacer Adjacent Motive – прилегающий к протоспейсеру мотив, имеющий структуру 5'-NGG-3', где N – любой нуклеотид). PAM должен прилегать непосредственно к участку узнавания направляющей РНК. Активированная Cas9 разрезает ДНК примерно в 4 п.н. от PAM, образуя ДЦР. Таким образом, система CRISPR/Cas9 не требует дизайна *de novo* белка для узнавания каждой новой мишени. Необходимо лишь подобрать последовательность спейсера, содержащую PAM, и синтезировать специфическую направляющую РНК. Дизайн направляющей РНК может быть осуществлен с помощью различных биоинформатических ресурсов, например, benchling (benchling.com) или CRISPRESSO (crispor.tefor.net). При этом следует обратить внимание не только на предсказанную активность направляющей РНК, но и на ее способность к неспецифической активности (Off Target activity). Неспецифическая активность существенно затрудняет проведение эксперимента при редактировании генов, кодирующих повторяющиеся домены (например, в коллагенах) или высоко консервативные белки (такие, как кератины). Как правило, все целевые клоны после редактирования должны подвергаться широкомасштабному секвенированию, чтобы выявить возможную неспецифическую активность программируемой нуклеазы.

Кроме собственно Cas9, при редактировании генома используют разные мутантные варианты этого белка: Cas9n D10A [32]; BE-HF1,2,4; FokI-dCas9; espCas9 [78]; а также другие системы, например, Cpf1 (CRISPR/Cas12, asCas12 система V-типа, выделенная из *S. aureus*), специфичные к другой последовательности PAM. Опубликованный недавно новый вариант Cas12 – Cas12f1, модифицированный из фермента архей Un1Cas12f1, обладает большей эффективностью и специфичностью, чем asCas12a, имеет меньший размер, позволяющий использовать AAV (AAV2) для доставки системы Cas12f1 в эукариотические клетки [79]. С помощью этой нуклеазы проведено эффективное

редактирование точечных патологических мутаций, в частности, в гене *KRT1* [79].

Типы мутаций и их нуклеотидное окружение как контекст, определяющий выбор стратегии редактирования генома

Выбор стратегии редактирования генома в большой степени зависит от того, каким путем должна идти репарация ДНК для устранения мутации. В основном это выбор между HDR и c-NHEJ. Предпочтительность HDR обусловлена высокой точностью редактирования мутаций, хотя основным фактором выбора пути является генетический контекст: доминантный/рецессивный статус мутации ее локальное нуклеотидное окружение [30, 77].

Во-первых, c-NHEJ можно применять для нокаута мутантного аллеля доминантного типа. С этой целью можно использовать направляющую РНК, которая специфически отжигается на нуклеотидной последовательности гена непосредственно приближенной к мутации (рис. 2а). Этот подход позволяет восстановить рамку считывания, нарушенную мутацией – к восстановлению рамки считывания могут привести инсерции или делеции, возникающие в процессе репарации. Однако репарация чаще приводит к появлению преждевременного стоп-кодона, нарушающего рамку считывания, что важно, например, при коррекции мутации доминантного типа в *COL7A1* [81]. Из библиотеки клонов, содержащих инсерции или делеции в этой области, выбирают те, в которых произошло восстановление рамки считывания *COL7A1*. Важное значение в выборе метода редактирования (в том числе дизайна эффективных направляющих РНК) имеет нуклеотидное окружение мутации, в частности, возможность подбора такой направляющей РНК, применение которой при редактировании мутации доминантного типа приведет к образованию преждевременных стоп-кодонов [82]. Во-вторых, c-NHEJ можно использовать для нарушения сплайсинга, т.е. опосредованная CRISPR/Cas9 репарация может привести к вырезанию экзона в неправильной рамке считывания или к “пропуску” экзона (рис. 2б). В-третьих, возможный механизм направленного пропуска одного или нескольких экзонов, при котором используются две разные направляющие РНК, специфические к последовательностям разных экзонов и интронов. В результате, помимо делеции участка, содержащего мутацию, устраняется один или несколько экзонов и восстанавливается рамка считывания. Один и тот же вариант пропуска экзона (экзонов) можно использовать у разных пациентов при разных мутациях, локализованных в данной области. Этот механизм применим только к гену *COL7A1*, имеющему множество экзонов в одной рамке считывания. Примеры ис-

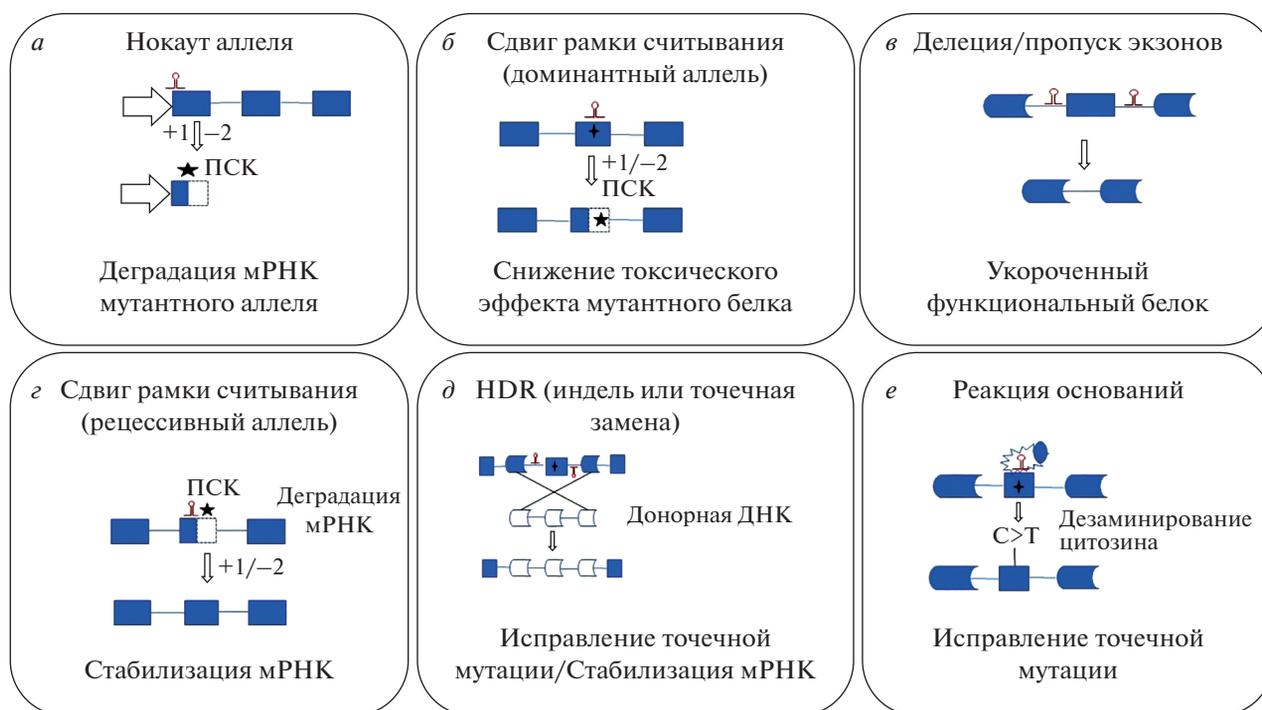


Рис. 2. Стратегии редактирования генома, предлагаемые для развития новых методов генотерапии генодерматозов.

 – направляющая РНК (здесь подразумевается работа системы CRISPR/Cas9). ПСК – преждевременный стоп-кодон, вызывающий в определенных условиях деградацию мРНК. HDR – направляемая гомологией репарация.

пользования некоторых подходов к редактированию геномов приведены на рис. 2. Нокаут, сдвиг рамки считывания, пропуск экзонов – эти методы, применяемые *in vitro* или *in vivo*, могут использоваться при введении компонентов системы CRISPR/Cas в виде РНК-белковых комплексов или плазмид.

Для редактирования гена *COL7A1* и восстановления экспрессии *C7* применяются различные методы. Ген *COL7A1* имеет сложную структуру, он содержит 118 экзонов и множество повторяющихся последовательностей в области коллагенового и фибронектин-подобного доменов. В чем состоят преимущества стратегий геномного редактирования в случае гена *COL7A1*? База мутаций, вызывающих РДБЭ, содержит более 800 различных мутаций. Возможность сайт-специфического дизайна направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9 существенно расширяет возможности направленного воздействия на мутацию. Большой размер гена *COL7A1* (31 т.п.н.) не позволяет использовать эффективные системы доставки полноразмерных копий кДНК (например, AAV-векторы) в клетки, но для редактирования генома донорными ДНК могут использоваться разные фрагменты гена, в которые вносят нужные изменения, встраивают кассеты генов для селекции или вносят SNP. Важное значение имеет

сохранение эндогенной регуляции экспрессии гена *COL7A1*, промотор которого содержит регуляторные элементы, связывающие транскрипционные факторы AP-1 и SMAD, стимулирующие активность промотора [85].

В гене *COL7A1* обнаружены многочисленные мутации, однако некоторые из них, например, инсерция с.6527 insC в экзоне 80, чаще других используются для редактирования генома. Эта мутация приводит к появлению преждевременного стоп-кодона и деградации мРНК в результате NMD, она с высокой частотой встречается в европейской популяции больных РДБЭ (найдена примерно у 46% больных РДБЭ в Испании). Описана коррекция с.6527 insC с использованием обоих механизмов репарации (с-NHEJ и HDR) [86]. С помощью HDR получены отдельные клоны с восстановленной экспрессией *C7*. Воздействие TALEN на геномную ДНК без донорной последовательности привело к образованию набора делеций и инсерций, при этом в ряде случаев происходил сбой рамки считывания (рис. 2а). В результате удалось найти и отобрать несколько клонов с восстановленной открытой рамкой считывания *COL7A1*. В обоих случаях (после и с-NHEJ, и HDR) у мышей с иммунодефицитом, которым ксенотрансплантировали эпидермальные эквиваленты кожи, полученные после редактирова-

ния генома, выявили синтез *C7* и образование структур, похожих на якорные фибриллы человека. Интересно, что некоторые клетки с продуктом *c-NHEJ* сильнее экспрессировали *C7*, чем клетки, в которых прошла HDR. Нельзя исключить и роль случайного мутагенеза, который может позитивно повлиять на экспрессию или фолдинг белка. Проведено также редактирование этой же мутации с помощью CRISPR/Cas9 [87]. *c-NHEJ* после воздействия Cas9 использовали для изменения открытой рамки считывания гена *COL7A1*, что привело к восстановлению экспрессии *C7* (рис. 2з). Описано эффективное применение РНК-белкового комплекса CRISPR/Cas9 с двумя направляющими РНК при редактировании все той же мутации с использованием *c-NHEJ* [88].

Эпидермолитический ихтиоз, вызываемый мутациями в гене *KRT10*, имеет, как правило, аутомно-доминантное наследование. Белок K10, кодируемый геном *KRT10*, экспрессируется в дифференцированных кератиноцитах супрабазального слоя эпидермиса (табл. 1). Нарушения в структуре K10 приводят к его агрегации в сети промежуточных филаментов в дифференцированных кератиноцитах, цитолизу в верхнем шиповидном и зернистом слое эпидермиса и повышенной чувствительности кератина к тепловому стрессу. В 2018 году March и соавт. применили геномное редактирование с помощью TALEN-доменов для нокаута мутантного аллеля *KRT10* в иммортализованных кератиноцитах пациента с гетерозиготной мутацией *c.1333G >A* [25]. *c-NHEJ* имела высокую эффективность (56.8%) и привела (без дополнительной селекции) к появлению клонов с преждевременными стоп-кодонами в мРНК, несущей мутацию, найденную при эпидермолитическом ихтиозе, и к деградации этой мРНК (рис. 2а). Аберрантная экспрессия K10B в отобранных клетках не обнаружена.

В 2016 году Shinkuma S. и соавт. применили редактирование гена *COL7A1* для нокаута доминантной мутации в экзоне 109, вызывающей ДДБЭ [81]. Секвенирование геномной ДНК из клеток периферической крови пациента с ДДБЭ выявило гетерозиготную мутацию *c.8068_8084delinsGA* в гене *COL7A1* – делецию 17 н. и инсерцию 2 н. В мРНК, считанной с мутантного аллеля, сохранялась открытая рамка считывания *COL7A1*, но ее белковый продукт был укорочен на пять аминокислотных остатков, причем эта делеция затрагивала область Gly-X-Y-повторов коллагенового домена *C7*. Доминантно-негативное действие данной мутации проявлялось в том, что укороченный мутантный белок, участвуя в посттрансляционном процессинге, модификации и тримеризации *C7*, приводил к образованию нефункционального тримера *C7*. Редактирование генома, в данном случае с использованием механизма *c-NHEJ*, с целью репарации ДЦР, привел

к получению набора клонов, в которых мутантный аллель не экспрессировался. В этой работе CRISPR/Cas9-редактирование оказалось в 2–3 раза эффективнее, чем применение TALEN-доменов. Из четырех клонов отобрали один, в котором CRISPR/Cas9-редактирование привело к получению укороченного транскрипта, не подверженного деградации посредством NMD (рис. 2б). После репрограммирования и ПСК в фибробласты проверили экспрессию коллагена типа VII. Образование тримера *C7* оценили с помощью ко-иммунопреципитации мутантных белков *C7*, имеющих FLAG- и HA-таги. Взаимодействие интактного продукта с мутацией *COL7A1* с белком, не содержащим мутаций, сравнивали с взаимодействием продукта из клеток, в которых проведено редактирование *COL7A1*. Фрагмент отредактированного гена, содержащий экзон 109 в другой рамке считывания, приводил к появлению белкового продукта, не участвующего в образовании тримера *C7*. В результате именно данная мутация и сдвиг рамки считывания, полученный после редактирования, восстановили функции *C7* в клетках, изогенных клеткам пациента с ДДБЭ.

Систему CRISPR/Cas9 использовали для редактирования генома клеток с другой рецессивной мутацией в экзоне 70 *COL7A1* – *c.5819delC* (*p.Pro1940Argfs*65*) – с высокой частотой встречающейся у пациентов с РДЭБ в Японии [89]. Изменение рамки считывания в результате *c-NHEJ* привело в этом случае к уничтожению преждевременных стоп-кодонов и появлению транскрипта, не подверженного деградации [90]. Интересно, что для восстановления экспрессии мутантного аллеля *COL7A1* в процессе редактирования не потребовалась донорная ДНК (рис. 2в). Использование направляющей РНК с PAM в области мутации увеличило эффективность редактирования мутантного аллеля.

Редактирование генома в первичных кератиноцитах человека с помощью системы CRISPR/Cas9 позволило создать модель синдрома Нидертонна и применить генную терапию с помощью лентивирусного замещения гена [29]. *c-NHEJ* вызывали в клетках после введения CRISPR/Cas9 и двух направляющих РНК к экзону 1 гена *SPINK5*. В результате получили линию клеток с нокаутом гена *SPINK5* ($\Delta SPINK5$), моделирующего доминантно-негативную мутацию, приводящую к развитию синдрома Нидертонна. Ксенотрансплантация эпидермальных графтов, содержащих генетически модифицированные клетки, мышам с иммунодефицитом привела к появлению фенотипа с гиперкератозом. Трансдукция лентивирусом, несущим рекомбинантный кДНК гена *rvSPINK5* без мутации, клеток с генотипом $\Delta SPINK5$ (без экспрессии белка LEKTI – продукта *SPINK5*) привела к восстановлению экспрессии LEKTI (табл. 1) [29]. Ученые из Австрии и Германии использова-

ли домены TALEN для избирательного нокаута мутантного аллеля гена *KRT5* [31]. Направление нуклеазы на участок последовательности в 5'-области гена привело к нокауту мутантного аллеля (рис. 2а) наравне с аллелем дикого типа. Эффективность нокаута и отбор клеток с инактивированным мутантным аллелем проверяли с помощью прижизненной флуоресцентной локализованной микроскопии. Обнаружены сильные различия в локализации флуоресцентного репортера, экспрессируемого в одной рамке считывания с *KRT5* дикого типа, и с мутантным геном *KRT5*. Мутации, вызывающие БЭП, чаще всего относятся к доминантно-негативным. Устранить такие мутации можно, используя сходный подход, однако всякий раз требуется проверка, поскольку возможно образование укороченных транскриптов, которые избежали действия NMD, но воздействуют на клетку доминантно-негативным образом.

Методы редактирования с использованием репарации, направляемой гомологией (HDR)

HDR для биомедицины. HDR можно применять как к доминантно, так и к рецессивно наследуемым мутациям, что позволяет рассматривать ее как универсальный метод редактирования (рис. 2д). Задача геномного редактирования с помощью HDR в контексте генодерматозов состоит во внесении уникальной точечной мутации в последовательность гена, не затронув при этом ни рамку считывания, ни важные кодирующие или регуляторные области других генов. Изогенные клеточные линии, отличающиеся от исходной первичной линии лишь одним нуклеотидом, служат основой для получения биомедицинского клеточного продукта, пригодного для аутологической трансплантации. В этом продукте восстановлены функции поврежденного белка, при этом он аутологичен клеткам пациента. Однако необходимо также контролировать отсутствие иммунного ответа пациента на новый антиген, продукт генной терапии. Основную проблему представляет крайне низкая эффективность процесса HDR, особенно в первичных клетках. Для биомедицинского применения HDR необходимо повысить эффективность доставки системы редактирования в клетки и разработать эффективные методы отбора клеток, прошедших редактирование. В настоящее время существует несколько стратегий отбора целевых клонов, таких как проточная цитофлуориметрия, селекция с помощью антибиотиков и отбор с помощью чувствительных методов цифровой ПЦР. С этой целью в молекулы донорных ДНК вводят гены устойчивости к антибиотикам или кДНК генов флуоресцентных белков, а также дополнительные молчащие мутации, позволяющие отличить исходную

ДНК от донорной [32, 64, 91]. Редактированию с использованием HDR подвергали первичные кератиноциты и фибробласты, а также иПСК [91]. Редактирование, опосредованное CRISPR/Cas9, проводили также на органоидах с помощью метода, называемого независимым от гомологии трансгенезом органоидов (от англ. Homology-independent Organoid Transgenesis, CRISPR-HOT). Использование флуоресцентного репортера позволило увеличить эффективность отбора после редактирования [92]. Двойной флуоресцентный репортер применяли для детекции и количественной оценки ДЦР в геноме, определения прошедшей в клетках HDR или с-NHEJ [93].

Если рассматривать методы редактирования генодерматозов с применением HDR в хронологическом порядке, то первыми были опубликованные в 2013 году работы с применением TALEN [76]. В культивируемых первичных фибробластах больного с диагнозом РДБЭ устранили точечную мутацию, приведшую к образованию преждевременного стоп-кодона в экзоне 14 гена *COL7A1*. В последовательность донорной ДНК для анализа отличий отредактированного аллеля от исходного вводили точечные мутации: целевую с.1837 T>C, а также “молчащую” мутацию полиморфизма T>C, разрушающую сайт расщепления рестриктазой Aра1. Прошедшие редактирование клоны удалось нарастить до количеств, превосходящих используемые при трансплантации пациенту (более 5×10^8 клеток). Затем из первичных фибробластов, прошедших генетическую коррекцию, получили изогенные иПСК. Заметим, что еще раньше был опубликован метод генетической коррекции доминантно-негативной мутации в гене *KRT14* в кератиноцитах больного с БЭП [30]. HDR проходила с донорной молекулой на основе AAV6, содержащей последовательность гена *GFP* вместо экзона 3 *KRT14* и фрагмент промотора *KRT14* для направленной специфической рекомбинации. Показано, что эффективность HDR была выше, чем при случайной интеграции вирусной последовательности в геном.

С использованием HDR с участием донорной ДНК на основе gAAV (штамм AAV-DJ) проведено также редактирование мутации в *COL7A1* в иПСК, изогенных клеткам пациентов с РДБЭ [34]. Известно, что у пациентов с генерализованной формой РДБЭ часто развивается агрессивный плоскоклеточный рак. Однако неясно, обусловлено ли это хроническим воспалением или связано с измененной регуляцией экспрессии генов, вызванной недостатком C7. В описанной выше работе сравнили паттерны генной экспрессии в иПСК пациентов и в иПСК здоровых доноров, полученных репрограммированием [34]. Удалось выявить повышение экспрессии группы генов, связанных с предрасположенностью к развитию плоскоклеточного рака. Опосредованный

CRISPR/Cas9 нокаут этих генов позволил получить популяцию изогенных клеток, не экспрессирующих некоторые гены, способствующие развитию плоскоклеточного рака [34]. Проведено также опосредованное CRISPR/Cas9 редактирование изогенных и ПСК двух пациентов с РДБЭ, у одного из которых найдена гомозиготная инсерция в экзоне 19 (с.2470insG), а у второго – сложная гетерозиготная мутация в экзонах 19 и 32 (с.2470insG/с.3948insT) [91]. HDR проведена с использованием короткого одноцепочечного олигонуклеотидного донора (ООД) и плазмиды, содержащей CRISPR/Cas9. Введение в состав этой плазмиды последовательности, кодирующей mCherry, позволило отобрать нужную популяцию клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. Вполне закономерно, что эффективность HDR была ниже в случае гомозиготной мутации (10%) и выше для гетерозиготного аллеля (40%). Показано также, что кератиноциты и фибробласты, репрограммированные из иПСК, содержали специфические для этих клеток маркеры дифференцировки. В этих кератиноцитах и фибробластах, выращенных в условиях 3D эквивалента кожи, после ксенотрансплантации образца эквивалента мышам с иммунодефицитом восстанавливалась экспрессия *C7*. Наличие якорных фибрилл показано с помощью просвечивающей электронной микроскопии срезов реконструированного эквивалента кожи [91].

В 2018 году Izmyryan и соавт. с помощью CRISPR/Cas9 провели успешное редактирование генома первичных кератиноцитов и фибробластов пациента с нонсенс-мутацией в экзоне 2 *COL7A1*(с.189delG) [94]. В качестве донора для HDR использовали лентивирус, не способный к интеграции в геном, без гена устойчивости к антибиотикам и флуоресцентного репортера. Эффективность HDR, оцененная с помощью цифровой капельной ПЦР, составила 11 и 15.7% в кератиноцитах и фибробластах соответственно. Это весьма высокие показатели, если принять во внимание первичные клетки с низкой эффективностью HDR и отсутствием селекции после редактирования.

Обнаружено, что не во всех успешно прошедших редактирование клетках происходит эффективное восстановление экспрессии *C7*, т.е. эффективности редактирования гена и восстановления экспрессии *C7* часто различаются. Свой вклад вносит соотношение гетеро- и гомозиготных мутаций после редактирования генома, пролиферативный потенциал клеток, их способность к дифференцировке, а также доля эпидермальных стволовых кератиноцитов с высоким пролиферативным потенциалом [95].

Интересен опыт редактирования генома гемопоэтических стволовых клеток CD34⁺, в результате которого в этих клетках увеличилась экспрессия *C7* [96]. Редактирование проведено с по-

мощью CRISPR/Cas9 и AAV6 в качестве донора для HDR. В регуляторную область гена *COL7A1* встраивали промоторный участок гена *PPP1R12C* с акцепторным сайтом сплайсинга и ген *GFP* для отбора отредактированных клонов с помощью проточной цитофлуориметрии.

Опосредуемое CRISPR/Cas9 редактирование генома проводили на модели ПоБЭ с мутацией R635X в гене *LAMB3*, кодирующем субъединицу ламинина 332 [97]. В этой работе для доставки CRISPR/Cas9 использовали аденовирус, а донорную ДНК вводили в состав модифицированного лентивируса, не способного к интеграции в геном.

Пропуск экзона как метод терапии ВБЭ. Показана возможность пропуска некоторых экзонов гена *Col7A1* (экзоны 3, 80, и 105) и функциональная значимость образующегося в результате этого укороченного продукта [98]. Судя по опубликованным данным, список таких экзонов *COL7A1*, обнаруженных в различных популяциях, еще шире [99–101]. Изучение значимости пропуска экзонов, проведенное на группе пациентов с ДДБЭ и РДБЭ в Нидерландах, позволило сделать вывод, что пропуск экзона может вызвать развитие более легкой формы заболевания с более стабильным состоянием только у пациентов с рецессивной формой заболевания [102]. На основании этого можно рекомендовать использование направленного пропуска экзона как метода коррекции мутаций, вызывающих РДБЭ. Если направить Cas9 на специфическое разрезание ДНК в области интронов, прилегающих к экзону, содержащему мутацию, то, имея специфические сайты для направляющих РНК, можно изменить последовательность целевой мРНК. Терапевтический эффект основан на использовании укороченного функционального белка, синтезируемого с модифицированной мРНК, полученной в результате изменения сплайсинга и пропуска ряда экзонов (рис. 2в).

Впервые пропуск экзона применили в генной терапии мышечной дистрофии Дюшенна [103]. Ген дистрофина, как и *COL7A1*, содержит домены, в состав которых входят экзоны, локализованные в одной рамке считывания. Исходно для пропуска экзонов, несущих мутацию, применяли антисмысловые олигонуклеотиды, действующие на сплайсинг пре-мРНК [104].

Методы повышения эффективности редактирования с участием HDR. Во многих сравнительных исследованиях эффективности работы системы CRISPR/Cas9 показано, что использование РНК-белкового комплекса Cas9 с cr/tracrRNA более эффективно, чем плазмид, их кодирующих. Для редактирования генома при генодерматозах применяют оба метода, поскольку использование плазмид более экономично и очень удобно [32, 46, 91].

В 2013 году была предложена мутантная Cas9 (Cas9n) – никаза. Нарушение активности RuvC-домена (благодаря мутации D10A) никазы позволило сильно снизить ее неспецифическую активность при редактировании [105]. Практически сразу никазу начали применять для редактирования мутаций, вызывающих генодерматозы, прежде всего ВБЭ. Редактирование мутаций в генах *KRT14* и *COL7A1*, приводящих к БЭП и РДБЭ, показало, что одновременное введение двух направляющих РНК сильно увеличивает эффективность HDR и снижает неспецифические эффекты [32, 106]. Высокая эффективность HDR подтверждается тем, что последствия с-NHEJ обнаруживаются только в 11% клонов из более 80%, отредактированных с помощью HDR [106].

Для увеличения эффективности редактирования применяют подходы, позволяющие избежать повторного разрезания ДНК уже отредактированного локуса. Например таких, как внесение в донорную ДНК блокирующих мутаций, препятствующих повторному узнаванию комплексом CRISPR/Cas9, с возможностью последующего устранения этих мутаций [107]. Примерно в половине работ, посвященных редактированию генома при ВБЭ, используется одноцепочечный донор и, в значительной части, – двухцепочечная матрица с возможностью последующей селекции [82]. В обоих случаях в донорные ДНК вносят “молчашие” нуклеотидные замены, которые не меняют аминокислотную последовательность, но приводят к образованию сайта узнавания эндонуклеазой рестрикции, что позволяет отличать клоны, подвергнутые HDR, от исходных матриц [32]. В случае двухцепочечных донорных молекул для селекции клонов, продуктов гомологичной рекомбинации, применяют кассеты, кодирующие флуоресцентные маркеры или гены устойчивости к антибиотику [32, 82].

Методы доставки компонентов системы редактирования постоянно совершенствуются. Например, разработаны подходы к доставке компонентов с помощью электропорации [51], наночастиц [108], трансдукции вирусных частиц и трансфекции плазмид.

Интерес представляет применение транспозона *piggyBac* для введения кассеты с геном устойчивости к антибиотику в плазмиду, несущую донорную ДНК, для HDR. Применение этого метода на иПСК позволило отредактировать мутации в двух экзонах гена *COL7A1* с помощью CRISPR/Cas9 [64]. Редактирование преждевременного стоп-кодона – мутации с.2005 С > Т (р. R669*) в экзоне 15, подтверждено секвенированием. С помощью Вестерн-блот-анализа получено подтверждение экспрессии полноразмерного С7 после репрограммирования иПСК в кератиноциты. Преимущество данной системы состоит в том, что

последовательность *piggyBac* можно легко бесследно удалить из генома отредактированных клеток с помощью HDR.

Редакторы оснований (РО)

Дезаминирование, происходящее с удалением аминогруппы из молекулы, приводит к транзициям, заменам А:Т на G:C в ДНК. В редактировании геномов используют также дезаминазы, работающие в тандеме с модифицированными программированными нуклеазами, так называемые Редакторы Оснований (РО) [109]. Главным преимуществом этого подхода считается отсутствие генотоксического эффекта (без накопления ДЦР не активируется система репарации). Совершенствование систем РО путем направленной эволюции и белковой инженерии привело к созданию высокоточных систем с повышенной специфичностью. Важным параметром РО-систем является “сужение окна” активности дезаминазы на ДНК в пределах нескольких нуклеотидов от направляющей РНК [110, 111]. РО также применили в генотерапии РДБЭ [112]. Новая система редактирования, содержащая аденозиндезаминазу (ABE, от англ. Adenosine deaminase Base Editor) в составе химерного белка с Cas9n, локально специфически дезаминирует А:Т в G:C, не внося при этом ДЦР в ДНК. Предложена также система на основе цитозиндезаминазы (CBE), которая в составе с никазой редактирует цитозин, осуществляя конверсию С:G в Т:А (рис. 2e). Эта система особенно ценна для редактирования в клетках человека, частыми мутациями в которых являются замены Т:А на С:G [113].

Интерес представляет редактирование мутации в гене, кодирующем транслугтаминазу 1 (TGM1) (рис. 1). Мутация с.607С > Т приводит к ламеллярному ихтиозу – орфанному аутосомно-рецессивному заболеванию человека (табл. 1). У семейной пары с одинаковой гетерозиготной мутацией в этом гене случалось невынашивание беременности. Секвенирование показало возникновение *de novo* герминальной мутации, поскольку более 98% спермы пациента содержало эту мутацию. С помощью двух разных РО на основе цитидиндезаминаз семейства APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) – SC-ABE max и ABE max-NG – проведено редактирование на зиготах. Использование этой системы обеспечило 73%-ную эффективность редактирования [28]. Таким образом показано успешное редактирование с помощью РО *in vivo* на эмбрионах.

Новые методики редактирования

Эффективность редактирования можно повысить путем изменения экспрессии факторов, влияющих на процесс.

яющих на репарацию ДЦР, с помощью увеличения специфичности систем редактирования и эффективности селекции клеток после редактирования.

Снижение экспрессии p53 в клетках млекопитающих увеличивает эффективность опосредованного CRISPR/Cas9 редактирования [114]. P53 стимулирует транскрипцию гена *CKI*, кодирующего белок p21, который блокирует переход клетки на следующую стадию клеточного цикла, останавливая его либо в фазе G1, либо в G2/M-переходе. Недавно показали, что активность CRISPR/Cas9 в клетках пигментного эпителия сетчатки с инактивированным p53 выше, чем в клетках с интактным белком p53 [114]. Активация p53 при генотоксическом стрессе приводит к дифференцировке и ПСК, обеспечивая таким образом стабильность генома стволовых клеток [115]. Если для редактирования генома используют и ПСК, то временный нокаун гена *Trp53*, кодирующего p53, или экспрессия доминантно-негативного мутантного варианта p53 могут привести к повышению эффективности редактирования [116].

При редактировании с использованием с-ННЕJ скрининг приходится проводить без обогащения отредактированных клеток с помощью селекции. Разнообразие возможных исходов репарации может затруднять процесс получения нужных клонов, поэтому разрабатывается множество моделей, направленных на предсказание этих результатов. Большинство из них основано на анализе данных, полученных после редактирования с использованием библиотек направляющих РНК [117–119]. Эти подходы могут быть полезными при подборе эффективных направляющих РНК и выборе участков для внесения разрыва. В некоторых работах результаты репарации предсказывают на основе поиска коротких гомологичных участков в области разрыва. В этом случае репарация может идти по более предсказуемому пути – с помощью соединения концов на основе коротких участков микрогомологии (ММЕJ, от англ. Microhomology Mediated End Joining) [120, 121]. Этот вид репарации можно использовать в качестве вспомогательного инструмента для бесшовного вырезания селективной кассеты после редактирования методом HDR [122].

Альтернативным подходом к редактированию с внесением одного или двух одноцепочечных разрывов является система prime editing (PE), которая позволяет вносить в геном короткие инсерции и делеции, а также более длинные фрагменты последовательности. Эта система состоит из гибридного белка spCas9 (H840A) в одной рамке считывания с обратной транскриптазой и модифицированной направляющей РНК, которая содержит на 3'-конце донорную последовательность для редактирования [123]. Проблемой при

использовании PE-системы является сложность конструирования эффективной модифицированной направляющей РНК, однако в этой области ведется активная работа [124]. Этот подход, несмотря на его новизну, начинают применять для редактирования мутаций, вызывающих генодерматозы (неопубликованные данные).

МОДЕЛИ ГЕНОДЕРМАТОЗОВ НА ЖИВОТНЫХ, СОЗДАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ

Появление системы CRISPR/Cas9, ставшей эффективным инструментом редактирования генома, расширило возможности моделирования генодерматозов. Изучение молекулярных аспектов заболеваний, например эпидермолитического ихтиоза [125], обычно начинают с создания моделей в клеточных культурах. Затем, при получении потенциально клинически значимых результатов, проводят доклинические исследования, для которых необходимо создание моделей на животных. Систему CRISPR/Cas9 можно использовать в эмбрионах животных и создавать с ее помощью мутации, ортологичные мутациям у человека [51]. Орфанные генодерматозы встречаются в изолированных популяциях диких животных или возникают в процессе селекции, например, мутации в гене *Col7a1* вызывают РДБЭ у собак некоторых пород [126, 127] и у фордервальдской породы крупного рогатого скота [128]. В гене тирозиназы макаков резусов найдена мутация, вызывающая альбинизм, сходный по проявлениям с глазочной альбинизмом у человека [129]. На модели РДБЭ у собак породы ретривер изучено влияние белковой терапии рекомбинантным С7 [83]. Однако применение данных моделей серьезно ограничивается структурными различиями кожи животных и человека. Так, например, только у новорожденных мышат структура эпидермиса сходна с эпидермисом человека. Недавно у нескольких детенышей из одного помета макаков резусов обнаружили мутацию в гене *krt5*, вызывающую тяжелую форму БЭП [130]. В 1999 году создали мышей с нокаутом гена *Col7a1*, у которых с помощью стабильной интеграции открытую рамку считывания в области экзонов 46–69 заменили на ген устойчивости к неомицину. Однако такие мыши умирали через 2 недели после рождения [131]. Впоследствии получили другую линию гипоморфных мышей, которые имели все признаки тяжелого заболевания при сохранении небольшого уровня экспрессии С7. Опосредованное рекомбиназой С7 встраивание кассеты устойчивости к неомицину разрывало рамку считывания коллагена после второго экзона, что привело к значительному снижению количества белка [132]. Интересно, что в тканях гомозиготных трансген-

ных животных оставалось некоторое количество С7 (около 10%): синтез полноразмерного транскрипта происходил, как выяснилось, за счет аберрантного сплайсинга в области экзона 2 *Col7a1* [132]. Впоследствии получили модели с индуцибельным нокаутом *Col7a1*. С этой целью использовали Cre-рекомбиназу, при помощи которой в ответ на добавление тамоксифена вырезали фрагмента гена, начиная с экзона 2 [133]. Эти модели использовали для проверки амелиоративного эффекта генотерапевтических продуктов, например, рекомбинантного белка С7, воздействия лентивирусной трансдукции, инъекций аллогенных мезенхимальных стволовых клеток [83, 134]. Индуцибельный нокаут *Col7a1* позволил уточнить время жизни С7 во внеклеточном матриксе (белок живет примерно 30 дней, ранее считалось, что намного дольше) и изучить механизмы нарушения заживления ран при РДБЭ, особенности образования грануляционной ткани и привлечение клеток, провоцирующих воспаление [135]. В 2017 году систему редактирования генома CRISPR/Cas9 применили *in vivo* сначала для создания гипоморфных мышей с мутацией в экзоне 80 *Col7a1*, а затем для редактирования этой мутации [51]. Получена линия мышей с нокаутом эндогенного гена *Col17* и встраиванием человеческого ортолога этого гена с мутацией, вызывающей буллезный пемфигоид — воспалительное аутоиммунное заболевание кожи. Образование пузырей и эрозий на коже при этом заболевании обусловлено выработкой антител IgG, направленных на компонент полудесмосом — антиген буллезного пемфигоида, белок BP180 [136]. На модели гуманизированной мыши проверен терапевтический эффект аллогенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток человека.

На мышах моделировали эпидермолитический ладонно-подошвенный кератоз, при котором наблюдаются нарушения в дифференцировке и пролиферации эпидермиса с гиперкератозом [137]. Ладонно-подошвенный кератоз вызывается аутосомно-доминантными мутациями в генах, кодирующих кератины. С целью моделирования этого заболевания получили трансгенных мышей с гетерозиготной мутацией — инсерцией с.434delAinsGGCT (р. Tyr144delinsTrpLeu) в *Krt9*. Эту мутацию удалили с применением CRISPR/Cas9 и одиночной направляющей РНК. Три инъекции этой системы *in vivo* привели к снижению уровня экспрессии К9 (до 14.6%) и проявлений кератодермии.

Использование методов редактирования генома для моделирования генодерматозов на животных существенно продвинуло изучение механизмов этих заболеваний, а в ряде случаев способствовало нахождению новых подходов к генной терапии этих патологий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стратегии генной терапии уже более 15 лет применяются при генодерматозах, в основном при ВБЭ. Большое внимание уделяется созданию генотерапевтических препаратов, доступных для пациентов с различными мутациями в одном и том же гене. Использование системы CRISPR/Cas9 и ее различных вариантов постепенно вытесняет остальные методы генотерапии. В настоящее время получено несколько патентов на использование подходов *ex vivo* редактирования гена *COL7A1*, мутации в котором вызывают ДБЭ. Редактирование генома первичных пациент-специфичных клеток применяется не меньше, чем редактирование полученных из них иПСК, с последующим репрограммированием в изогенные линии различного типа. Вошедшее в практику широкомасштабное секвенирование, проводимое после редактирования генома, позволяет быстро оценить его эффективность и наличие неспецифических (off target) эффектов. Определяющее значение для подбора стратегии геномного редактирования имеет тип мутации, характер ее наследования и нуклеотидное окружение. К доминантно-негативным мутациям можно применять методы редактирования с получением нокаутов. После редактирования мутантных аллелей для получения целевых клонов применяют функциональный отбор, направленный на восстановление нормального фенотипа. При редактировании рецессивно наследуемых мутаций чаще используют HDR, которая имеет низкую эффективность. Эффективность HDR повышают с помощью различных подходов, совершенствуют и методы доставки, и методы селективного отбора целевых клонов.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-29-04044) и Министерством науки и высшего образования (грант № 075-15-2019-1789 для Иваненко А.В.)

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

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Naso G., Petrova A. (2020) Cellular therapy options for genetic skin disorders with a focus on recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br. Med. Bull.* **136**, 30–45.
2. Kueckelhaus M., Rothoefl T., De Rosa L., Yeni B., Ohmann T., Maier C., Eitner L., Metz D., Losi L., Secone Seconetti A., De Luca M., Hirsch T. (2021) Transgenic epidermal cultures for junctional epidermolysis bullosa — 5-year outcomes. *N. Eng. J. Med.* **385**, 2264–2270.
3. Dinnes J., Deeks J.J., Chuchu N., Matin R.N., Wong K.Y., Aldridge R.B., Durack A., Gulati A., Chan S.A., Johnston L., Bayliss S.E., Leonardi-Bee J.,

- Takwoingi Y., Davenport C., O'Sullivan C., Tehrani H., Williams H.C. (2018) Visual inspection and dermoscopy, alone or in combination, for diagnosing keratinocyte skin cancers in adults. *Cochrane Database Systematic Rev.* **2018**, CD011901.
4. Dourado Alcorde M., Sogayar M.C., Demasi M.A. (2019) Patent landscape of molecular and cellular targeted therapies for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Exper. Opin. Therap. Patents.* **29**, 327–337.
 5. Lwin S.M., Syed F., Di W.-L., Kadiyirire T., Liu L., Guy A., Petrova A., Abdul-Wahab A., Reid F., Phillips R., Elstad M., Georgiadis C., Aristodemou S., Lovell P.A., McMillan J.R., Mee J., Miskinyte S., Titeux M., Ozoemena L., Pramanik R., Serrano S., Rowles R., Maurin C., Orrin E., Martinez-Queipo M., Rashidghamat E., Tziotzios C., Onoufriadis A., Chen M., Chan L., Farzaneh F., Del Rio M., Tolar J., Bauer J.W., Larcher F., Antoniou M.N., Hovnanian A., Thrasher A.J., Mellerio J.E., Qasim W., McGrath J.A. (2019) Safety and early efficacy outcomes for lentiviral fibroblast gene therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JCI Insight.* **4**, 126243.
 6. Saprashvili Z., Nguyen N.T., Gorell E.S., Loutit K., Khuu P., Furukawa L.K., Lorenz H.P., Leung T.H., Keene D.R., Rieger K.E., Khavari P., Lane A.T., Tang J.Y., Marinkovich M.P. (2016) Safety and wound outcomes following genetically corrected autologous epidermal grafts in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Am. Med. Assoc.* **316**, 1808–1817.
 7. Кубанов А.А., Чикин В.В., Карамова А.Э., Мончаковская Е.С. (2021) Наружная терапия больных врожденным буллезным эпидермолизом. *Вест. Дерматол. Венерол.* **97**, 6–19.
 8. Bardhan A., Bruckner-Tuderman L., Chapple I.L.C., Fine J.-D., Harper N., Has C., Magin T.M., Marinkovich M.P., Marshall J.F., McGrath J.A., Mellerio J.E., Polson R., Heagerty A.H. (2020) Epidermolysis bullosa. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **6**, 78.
 9. Yang W.S., Kang S., Sung J., Kleinman H.K. (2019) Thymosin β 4: potential to treat epidermolysis bullosa and other severe dermal injuries. *Eur. J. Dermatol. EJD.* **29**, 459–467.
 10. Feramisco J.D., Sadreyev R.I., Murray M.L., Grishin N.V., Tsao H. (2009) Phenotypic and genotypic analyses of genetic skin disease through the online Mendelian inheritance in man (OMIM) Database. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2628–2636.
 11. Rao R., Mellerio J., Bhogal B.S., Groves R. (2012) Immunofluorescence antigen mapping for hereditary epidermolysis bullosa. *Indian J. Dermatol., Venereol. Leprol.* **78**, 692–697.
 12. Yenamandra V.K., Bhari N., Ray S.B., Sreenivas V., Dinda A.K., Scaria V., Sharma V.K., Sethuraman G. (2017) Diagnosis of inherited epidermolysis bullosa in resource-limited settings: immunohistochemistry revisited. *Dermatol. (Basel).* **233**, 326–332.
 13. Ohashi M., Shu E., Nagai M., Murase K., Nakano H., Tamai K., Sawamura D., Hiroka T., Seishima M., Kitajima Y., Aoyama Y. (2011) Two cases of recessive dystrophic epidermolysis bullosa diagnosed as severe generalized. *J. Dermatology.* **38**, 893–899.
 14. Rossi S., Castiglia D., Pisaneschi E., Diociaiuti A., Stracuzzi A., Cesario C., Mariani R., Floriddia G., Zambruno G., Boldrini R., Abeni D., Novelli A., Zalggi R., El Hachem M. (2021) Immunofluorescence mapping, electron microscopy and genetics in the diagnosis and sub-classification of inherited epidermolysis bullosa: a single-centre retrospective comparative study of 87 cases with long-term follow-up. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV.* **35**, 1007–1016.
 15. Крылова Ю., Дробинцева А., Полякова В., Кветной И., Пантелеев Л., Мусихин С., Barzda В. (2015) Нелинейная оптическая микроскопия. *Биотехносфера.* 2–7.
 16. Anker P., Fésús L., Kiss N., Noll J., Becker K., Kuroli E., Mayer B., Bozsányi S., Lórinz K., Lihacova I., Lihachev A., Lange M., Wikonkál N., Medvecz M. (2021) Visualization of keratin with diffuse reflectance and autofluorescence imaging and nonlinear optical microscopy in a rare keratinopathic ichthyosis. *Sensors (Basel).* **21**, 1105.
 17. Has C., Bruckner-Tuderman L. (2014) The genetics of skin fragility. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **15**, 245–268.
 18. Coulombe P.A., Lee C.-H. (2012) Defining keratin protein function in skin epithelia: epidermolysis bullosa simplex and its aftermath. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 763–775.
 19. Goldberg I., Fruchter D., Meilick A., Schwartz M.E., Sprecher E. (2014) Best treatment practices for *Pachyonychia congenita*. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **28**, 279–285.
 20. Smith F.J., Hansen C.D., Hull P.R., Kaspar R.L., McLean W.I., O'Toole E., Sprecher E. (2006) *Pachyonychia congenita*. In: *GeneReviews®*. Eds Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J., Gripp K.W., Mirzaa G.M., Amemiya A. Seattle (WA): Univ. Washington, Seattle.
 21. van den Akker P.C., van Essen A.J., Kraak M.M.J., Meijer R., Nijenhuis M., Meijer G., Hofstra R.M.W., Pas H.H., Scheffer H., Jonkman M.F. (2009) Long-term follow-up of patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa in the Netherlands: expansion of the mutation database and unusual phenotype-genotype correlations. *J. Dermatol. Sci.* **56**, 9–18.
 22. Dang N., Murrell D.F. (2008) Mutation analysis and characterization of *COL7A1* mutations in dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp. Dermatol.* **17**, 553–568.
 23. Dang N., Klingberg S., Marr P., Murrell D.F. (2007) Review of collagen VII sequence variants found in Australasian patients with dystrophic epidermolysis bullosa reveals nine novel *COL7A1* variants. *J. Dermatol. Sci.* **46**, 169–178.
 24. Freiberg R.A., Choate K.A., Deng H., Alperin E.S., Shapiro L.J., Khavari P.A. (1997) A model of corrective gene transfer in X-linked ichthyosis. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 927–933.
 25. March O.P., Lettner T., Klausegger A., Ablinger M., Kocher T., Hainzl S., Peking P., Lackner N., Rajan N., Hofbauer J.P., Guttman-Gruber C., Bygum A., Koller U., Reichelt J. (2019) Gene editing-mediated disruption of epidermolytic ichthyosis-associated

- KRT10 alleles restores filament stability in keratinocytes. *J. Investigat. Dermatol.* **139**, 1699–1710.e6.
26. Magnaldo T., Sarasin A. (2004) *Xeroderma pigmentosum*: from symptoms and genetics to gene-based skin therapy. *Cells Tissues Organs.* **177**, 189–198.
 27. Warrick E., Garcia M., Chagnoleau C., Chevallier O., Bergoglio V., Sartori D., Mavilio F., Angulo J.F., Avril M.-F., Sarasin A., Larcher F., Del Rio M., Bernerd F., Magnaldo T. (2012) Preclinical corrective gene transfer in xeroderma pigmentosum human skin stem cells. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **20**, 798–807.
 28. Dang L., Zhou X., Zhong X., Yu W., Huang S., Liu H., Chen Y., Zhang W., Yuan L., Li L., Huang X., Li G., Liu J., Tong G. (2022) Correction of the pathogenic mutation in *TGM1* gene by adenine base editing in mutant embryos. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **30**, 175–183.
 29. Gálvez V., Chacón-Solano E., Bonafont J., Mencía Á., Di W.-L., Murillas R., Llamas S., Vicente A., Del Rio M., Carretero M., Larcher F. (2020) Efficient CRISPR-Cas9-mediated gene ablation in human keratinocytes to recapitulate genodermatoses: modeling of Netherton syndrome. *Mol. Therapy – Meth. Clin. Dev.* **18**, 280–290.
 30. Petek L.M., Fleckman P., Miller D.G. (2010) Efficient KRT14 targeting and functional characterization of transplanted human keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa simplex. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **18**, 1624–1632.
 31. Aushev M., Koller U., Mussolino C., Cathomen T., Reichelt J. (2017) Traceless targeting and isolation of gene-edited immortalized keratinocytes from epidermolysis bullosa simplex patients. *Mol. Therapy. Meth. Clin. Dev.* **6**, 112–123.
 32. Kocher T., Peking P., Klausegger A., Murauer E.M., Hofbauer J.P., Wally V., Lettner T., Hainzl S., Ablinger M., Bauer J.W., Reichelt J., Koller U. (2017) Cut and paste: efficient homology-directed repair of a dominant negative KRT14 mutation via CRISPR/Cas9 nickases. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **25**, 2585–2598.
 33. Hirsch T., Rothoefl T., Teig N., Bauer J.W., Pellegrini G., De Rosa L., Scaglione D., Reichelt J., Klausegger A., Kneisz D., Romano O., Secone Seconetti A., Contin R., Enzo E., Jurman I., Carulli S., Jacobsen F., Luecke T., Lehnhardt M., Fischer M., Kueckelhaus M., Quaglino D., Morgante M., Bicciato S., Bondanza S., De Luca M. (2017) Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature.* **551**, 327–332.
 34. Sebastiano V., Zhen H.H., Haddad B., Derafshi B.H., Bashkirova E., Melo S.P., Wang P., Leung T.L., Siprashvili Z., Tichy A., Li J., Ameen M., Hawkins J., Lee S., Li L., Schwertschkow A., Bauer G., Lisowski L., Kay M.A., Kim S.K., Lane A.T., Wernig M., Oro A.E. (2014) Human COL7A1-corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci. Translat. Med.* **6**, 264ra163.
 35. van den Akker P.C., Mellerio J.E., Martinez A.E., Liu L., Meijer R., Dopping-Hepenstal P.J.C., van Essen A.J., Scheffer H., Hofstra R.M.W., McGrath J.A., Jonkman M.F. (2011) The inversa type of recessive dystrophic epidermolysis bullosa is caused by specific arginine and glycine substitutions in type VII collagen. *J. Med. Genet.* **48**, 160–167.
 36. Nickless A., Bailis J.M., You Z. (2017) Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell Biosci.* **7**, 26.
 37. Supek F., Lehner B., Lindeboom R.G.H. (2021) To NMD or not to NMD: nonsense-mediated mRNA decay in cancer and other genetic diseases. *Trends Genet.* **37**, 657–668.
 38. Khajavi M., Inoue K., Lupski J.R. (2006) Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur. J. Hum. Genet: EJHG.* **14**, 1074–1081.
 39. March O.P., Kocher T., Koller U. (2020) Context-dependent strategies for enhanced genome editing of genodermatoses. *Cells.* **9** (1), 112. doi.org/https://doi.org/10.3390/cells9010112
 40. Mecklenbeck S., Compton S.H., Mejía J.E., Cervini R., Hovnanian A., Bruckner-Tuderman L., Barrandon Y. (2002) A microinjected COL7A1-PAC vector restores synthesis of intact procollagen VII in a dystrophic epidermolysis bullosa keratinocyte cell line. *Hum. Gene Therapy.* **13**, 1655–1662.
 41. Sat E., Leung K.H., Bruckner-Tuderman L., Cheah K.S. (2000) Tissue-specific expression and long-term deposition of human collagen VII in the skin of transgenic mice: implications for gene therapy. *Gene Therapy.* **7**, 1631–1639.
 42. Di W.-L., Larcher F., Semenova E., Talbot G.E., Harper J.I., Del Rio M., Thrasher A.J., Qasim W. (2011) *Ex-vivo* gene therapy restores LEKTI activity and corrects the architecture of Netherton syndrome-derived skin grafts. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **19**, 408–416.
 43. Lwin S.M., Syed F., Di W.L., Kadiyirire T, Liu L., Guy A., Petrova A., Abdul-Wahab A, Reid F., Phillips R., Elstad M., Georgiadis C., Aristodemou., Lovell P.A., McMillan J.R., Mee J., Miskinyte S., Titeux M., Ozoemena L., Pramanik R., Serrano S., Rowles R., Maurin C., Orrin E., Martinez-Queipo M., Rashidghamat E., Tziotzios C., Onoufriadis A., Chen M., Chan L., Farzaneh F., Del Rio M., Tolar J., Bauer J.W., Larcher F., Antoniou M.N., Hovnanian A., Thrasher A.J., Mellerio J.E., Qasim W., McGrath J.A. (2019) Safety and early efficacy outcomes for lentiviral fibroblast gene therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JCI Insight.* **4**(11), e126243. https://doi.org/10.1172/jci.insight.126243
 44. Georgiadis C., Syed F., Petrova A., Abdul-Wahab A., Lwin S.M., Farzaneh F., Chan L., Ghani S., Fleck R.A., Glover L., McMillan J.R., Chen M., Thrasher A.J., McGrath J.A., Di W.-L., Qasim W. (2016) Lentiviral engineered fibroblasts expressing codon-optimized COL7A1 restore anchoring fibrils in RDEB. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 284–292.
 45. Mavilio F., Pellegrini G., Ferrari S., Di Nunzio F., Di Iorio E., Recchia A., Maruggi G., Ferrari G., Provasi E., Bonini C., Capurro S., Conti A., Magnoni C., Giannetti A., De Luca M. (2006) Correction of junction-

- al epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.* **12**, 1397–1402.
46. Melo S.P., Lisowski L., Bashkirova E., Zhen H.H., Chu K., Keene D.R., Marinkovich M.P., Kay M.A., Oro A.E. (2014) Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly recombinogenic AAV variant. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **22**, 725–733.
 47. Roedl D., Oji V., Buters J.T.M., Behrendt H., Braun-Falco M. (2011) rAAV2-mediated restoration of LEKTI in LEKTI-deficient cells from Netherton patients. *J. Dermatol. Sci.* **61**, 194–198.
 48. South A.P., Uitto J. (2016) Type VII collagen replacement therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa-how much, how often? *J. Invest. Dermatol.* **136**, 1079–1081.
 49. Eichstadt S., Barriga M., Ponakala A., Teng C., Nguyen N.T., Siplashvili Z., Nazarov J., Gorell E.S., Chiou A.S., Taylor L., Khuu P., Keene D.R., Rieger K., Khosla R.K., Furukawa L.K., Lorenz H.P., Marinkovich M.P., Tang J.Y. (2019) Phase 1/2a clinical trial of gene-corrected autologous cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JCI Insight.* **4**, 130554.
 50. Woodley D.T., Krueger G.G., Jorgensen C.M., Fairley J.A., Atha T., Huang Y., Chan L., Keene D.R., Chen M. (2003) Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 1021–1028.
 51. Wu W., Lu Z., Li F., Wang W., Qian N., Duan J., Zhang Y., Wang F., Chen T. (2017) Efficient *in vivo* gene editing using ribonucleoproteins in skin stem cells of recessive dystrophic epidermolysis bullosa mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 1660–1665.
 52. Gurevich I., Agarwal P., Zhang P., Dolorito J.A., Oliver S., Liu H., Reitze N., Sarma N., Bagci I.S., Sridhar K., Kakarla V., Yenamandra V.K., O'Malley M., Prisco M., Tufa S.F., Keene D.R., South A.P., Krishnan S.M., Marinkovich M.P. (2022) *In vivo* topical gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa: a phase 1 and 2 trial. *Nat. Med.* **28**(4), 780–789.
 53. Pasmooij A.M.G., Pas H.H., Bolling M.C., Jonkman M.F. (2007) Revertant mosaicism in junctional epidermolysis bullosa due to multiple correcting second-site mutations in LAMB3. *J. Clin. Invest.* **117**, 1240–1248.
 54. Umegaki-Arao N., Pasmooij A.M.G., Itoh M., Cerise J.E., Guo Z., Levy B., Gostyński A., Rothman L.R., Jonkman M.F., Christiano A.M. (2014) Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. *Sci. Translat. Med.* **6**, 264ra164.
 55. Jonkman M.F., Pasmooij A.M.G. (2009) Revertant mosaicism – patchwork in the skin. *N. Eng. J. Med.* **360**, 1680–1682.
 56. Twaroski K., Eide C., Riddle M.J., Xia L., Lees C.J., Chen W., Mathews W., Keene D.R., McGrath J.A., Tolar J. (2019) Revertant mosaic fibroblasts in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br. J. Dermatol.* **181**, 1247–1253.
 57. Tolar J., McGrath J.A., Xia L., Riddle M.J., Lees C.J., Eide C., Keene D.R., Liu L., Osborn M.J., Lund T.C., Blazar B.R., Wagner J.E. (2014) Patient-specific naturally gene-reverted induced pluripotent stem cells in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1246–1254.
 58. Sasaki M., Abe R., Fujita Y., Ando S., Inokuma D., Shimizu H. (2008) Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol.* **180**, 2581–2587.
 59. Geyer M.B., Radhakrishnan K., Giller R., Umegaki N., Harel S., Kiuru M., Morel K.D., LeBoeuf N., Kandel J., Bruckner A., Fabricatore S., Chen M., Woodley D., McGrath J., Baxter-Lowe L., Uitto J., Christiano A.M., Cairo M.S. (2015) Reduced toxicity conditioning and allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Pediatrics.* **167**, 765–769.e1.
 60. Fujita Y., Komatsu M., Lee S.E., Kushida Y., Nakayama-Nishimura C., Matsumura W., Takashima S., Shinkuma S., Nomura T., Masutomi N., Kawamura M., Dezawa M., Shimizu H. (2021) Intravenous injection of muse cells as a potential therapeutic approach for epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **141**, 198–202.e6.
 61. Rashidghamat E., Kadiyire T., Ayis S., Petrof G., Liu L., Pullabhatla V., Ainali C., Guy A., Aristodemou S., McMillan J.R., Ozoemena L., Mee J., Pramanik R., Saxena A., Nuamah R., de Rinaldis E., Serrano S., Maurin C., Martinez-Queipo M., Lwin S.M., Ilic D., Martinez A., Dazzi F., Slaper-Cortenbach I., Westinga K., Zeddies S., van den Broek M., Onoufriadis A., Mellerio J.E., McGrath J.A. (2020) Phase I/II open-label trial of intravenous allogeneic mesenchymal stromal cell therapy in adults with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Am. Acad. Dermatol.* **83**, 447–454.
 62. Masonic Cancer Center, University of Minnesota (2022) MT2015-20: biochemical correction of severe epidermolysis bullosa by allogeneic cell transplantation and serial donor mesenchymal cell infusions. *Clin. Trial Registration, Clinicaltrials.gov*
 63. Ebens C.L., McGrath J.A., Tamai K., Hovnanian A., Wagner J.E., Riddle M.J., Keene D.R., DeFor T.E., Tryon R., Chen M., Woodley D.T., Hook K., Tolar J. (2019) Bone marrow transplant with post-transplant cyclophosphamide for recessive dystrophic epidermolysis bullosa expands the related donor pool and permits tolerance of nonhaematopoietic cellular grafts. *Br. J. Dermatol.* **181**, 1238–1246.
 64. Itoh M., Kawagoe S., Tamai K., Nakagawa H., Asahina A., Okano H.J. (2020) Footprint-free gene mutation correction in induced pluripotent stem cell (iPSC) derived from recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) using the CRISPR/Cas9 and piggyBac transposon system. *J. Dermatol. Sci.* **98**, 163–172.
 65. Ruiz-Torres S., Lambert P.F., Wikenheiser-Bronk K.A., Wells S.I. (2021) Directed differentiation

- of human pluripotent stem cells into epidermal stem and progenitor cells. *Mol. Biol. Rep.* **48**, 6213–6222.
66. Wenzel D., Bayerl J., Nyström A., Bruckner-Tuderman L., Meixner A., Penninger J.M. (2014) Genetically corrected iPSCs as cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci. Translat. Med.* **6**, 264ra165.
 67. Itoh M., Kiuru M., Cairo M.S., Christiano A.M. (2011) Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 8797–8802.
 68. Blackford A.N., Jackson S.P. (2017) ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. *Mol. Cell.* **66**, 801–817.
 69. Kantidze O.L., Velichko A.K., Luzhin A.V., Petrova N.V., Razin S.V. (2018) Synthetically lethal interactions of ATM, ATR, and DNA-PKcs. *Trends Cancer.* **4**, 755–768.
 70. Goodarzi A.A., Yu Y., Riballo E., Douglas P., Walker S.A., Ye R., Härer C., Marchetti C., Morrice N., Jeggo P.A., Lees-Miller S.P. (2006) DNA-PK autophosphorylation facilitates *Artemis* endonuclease activity. *EMBO J.* **25**, 3880–3889.
 71. Her J., Bunting S.F. (2018) How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* **293**, 10502–10511.
 72. Mao Z., Bozzella M., Seluanov A., Gorbunova V. (2008) Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair.* **7**, 1765–1771.
 73. Symington L.S. (2016) Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 195–212.
 74. Shamanna R.A., Lu H., de Freitas J.K., Tian J., Croteau D.L., Bohr V.A. (2016) WRN regulates pathway choice between classical and alternative non-homologous end joining. *Nat. Commun.* **7**, 13785.
 75. Jayavaradhan R., Pillis D.M., Goodman M., Zhang F., Zhang Y., Andreassen P.R., Malik P. (2019) CRISPR-Cas9 fusion to dominant-negative 53BP1 enhances HDR and inhibits NHEJ specifically at Cas9 target sites. *Nat. Commun.* **10**, 2866.
 76. Osborn M.J., Starker C.G., McElroy A.N., Webber B.R., Riddle M.J., Xia L., DeFeo A.P., Gabriel R., Schmidt M., Von Kalle C., Carlson D.F., Maeder M.L., Joung J.K., Wagner J.E., Voytas D.F., Blazar B.R., Tolar J. (2013) TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol. Therapy.* **21**, 1151–1159.
 77. Jiang F., Zhou K., Ma L., Gressel S., Doudna J.A. (2015) Structural biology. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science (New York, N.Y.)*. **348**, 1477–1481.
 78. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* **351**, 84–88.
 79. Kim D.Y., Lee J.M., Moon S.B., Chin H.J., Park S., Lim Y., Kim D., Koo T., Ko J.-H., Kim Y.-S. (2022) Efficient CRISPR editing with a hypercompact Cas12f1 and engineered guide RNAs delivered by adeno-associated virus. *Nat. Biotechnol.* **40**, 94–102.
 80. Yang H., Ren S., Yu S., Pan H., Li T., Ge S., Zhang J., Xia N. (2020) Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. *Internat. J. Mol. Sci.* **21**, E6461.
 81. Shinkuma S., Guo Z., Christiano A.M. (2016) Site-specific genome editing for correction of induced pluripotent stem cells derived from dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 5676–5681.
 82. Kocher T., Koller U. (2021) Chapter three – Advances in gene editing strategies for epidermolysis bullosa. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **182**, 81–109.
 83. Gretzmeier C., Pin D., Kern J.S., Chen M., Woodley D.T., Bruckner-Tuderman L., de Souza M.P., Nyström A. (2022) Systemic collagen VII replacement therapy for advanced recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **142**(4), 1094–1102. e3.
 84. Zauner R., Wimmer M., Dorfer S., Ablinger M., Koller U., Piñón Hofbauer J., Guttman-Gruber C., Bauer J.W., Wally V. (2022) Transcriptome-guided drug repurposing for aggressive SCCs. *Internat. J. Mol. Sci.* **23**, 1007.
 85. Vanden Oever M., Muldoon D., Mathews W., Tolar J. (2021) Fludarabine modulates expression of type VII collagen during haematopoietic stem cell transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br. J. Dermatol.* **185**, 380–390.
 86. Chamorro C., Mencía A., Almarza D., Duarte B., Büning H., Sallach J., Hausser I., Del Río M., Larcher F., Murillas R. (2016) Gene editing for the efficient correction of a recurrent *COL7A1* mutation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes. *Mol. Therapy. Nucl. Acids.* **5**, e307.
 87. Mencía Á., Chamorro C., Bonafont J., Duarte B., Holguin A., Illera N., Llamas S.G., Escámez M.J., Hausser I., Del Río M., Larcher F., Murillas R. (2018) Deletion of a pathogenic mutation-containing exon of *COL7A1* allows clonal gene editing correction of RDEB patient epidermal stem cells. *Mol. Therapy. Nucl. Acids.* **11**, 68–78.
 88. Bonafont J., Mencía Á., García M., Torres R., Rodríguez S., Carretero M., Chacón-Solano E., Modamio-Høybjør S., Marinas L., León C., Escamez M.J., Hausser I., Del Río M., Murillas R., Larcher F. (2019) Clinically relevant correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa by dual sgRNA CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **27**, 986–998.
 89. Sawamura D., Goto M., Yasukawa K., Sato-Matsumura K., Nakamura H., Ito K., Nakamura H., Tomita Y., Shimizu H. (2005) Genetic studies of 20 Japanese families of dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Hum. Genet.* **50**, 543–546.
 90. Takashima S., Shinkuma S., Fujita Y., Nomura T., Ujiie H., Natsuga K., Iwata H., Nakamura H., Vorobyev A., Abe R., Shimizu H. (2019) Efficient gene re-framing therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa with CRISPR/Cas9. *J. Invest. Dermatol.* **139**, 1711–1721.e4.

91. Jacków J., Guo Z., Hansen C., Abaci H.E., Doucet Y.S., Shin J.U., Hayashi R., DeLorenzo D., Kabata Y., Shinkuma S., Salas-Alanis J.C., Christiano A.M. (2019) CRISPR/Cas9-based targeted genome editing for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa using iPSCs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**, 26846–26852.
92. Artegiani B., Hendriks D., Beumer J., Kok R., Zheng X., Joore I., Chuva de Sousa Lopes S., van Zon J., Tans S., Clevers H. (2020) Fast and efficient generation of knock-in human organoids using homology-independent CRISPR-Cas9 precision genome editing. *Nat. Cell Biol.* **22**, 321–331.
93. Eki R., She J., Parlak M., Benamar M., Du K.-P., Kumar P., Abbas T. (2020) A robust CRISPR-Cas9-based fluorescent reporter assay for the detection and quantification of DNA double-strand break repair. *Nucl. Acids Res.* **48**, e126.
94. Izmiryani A., Ganier C., Bovolenta M., Schmitt A., Mavilio F., Hovnanian A. (2018) *Ex vivo* COL7A1 correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using CRISPR/Cas9 and homology-directed repair. *Mol. Therapy—Nucl. Acids.* **12**, 554–567.
95. Kocher T., Bischof J., Haas S.A., March O.P., Liemberger B., Hainzl S., Illmer J., Hoog A., Muigg K., Binder H.-M., Klausegger A., Strunk D., Bauer J.W., Cathomen T., Koller U. (2021) A non-viral and selection-free COL7A1 HDR approach with improved safety profile for dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol. Therapy—Nucl. Acids.* **25**, 237–250.
96. Osborn M.J., Lees C.J., McElroy A.N., Merkel S.C., Eide C.R., Mathews W., Feser C.J., Tschann M., McElmury R.T., Webber B.R., Kim C.J., Blazar B.R., Tolar J. (2018) CRISPR/Cas9-based cellular engineering for targeted gene overexpression. *Internat. J. Mol. Sci.* **19**, E946.
97. Benati D., Miselli F., Cocchiarella F., Patrizi C., Carretero M., Baldassarri S., Ammendola V., Has C., Colloca S., Rio M.D., Larcher F., Recchia A. (2018) CRISPR/Cas9-mediated *in situ* correction of LAMB3 gene in keratinocytes derived from a junctional epidermolysis bullosa patient. *Mol. Therapy.* **26**, 2592–2603.
98. Bornert O., Kühl T., Bremer J., van den Akker P.C., Pasmooij A.M., Nyström A. (2016) Analysis of the functional consequences of targeted exon deletion in COL7A1 reveals prospects for dystrophic epidermolysis bullosa therapy. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **24**, 1302–1311.
99. Koga H., Hamada T., Ishii N., Fukuda S., Sakaguchi S., Nakano H., Tamai K., Sawamura D., Hashimoto T. (2011) Exon 87 skipping of the COL7A1 gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Dermatol.* **38**, 489–492.
100. McGrath J.A., Ashton G.H., Mellerio J.E., Salas-Alanis J.C., Swensson O., McMillan J.R., Eady R.A. (1999) Moderation of phenotypic severity in dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa through in-frame skipping of exons containing nonsense or frameshift mutations. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 314–321.
101. Saito M., Masunaga T., Ishiko A. (2009) A novel *de novo* splice-site mutation in the COL7A1 gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa (DDEB): specific exon skipping could be a prognostic factor for DDEB pruriginosa. *Clin. Exp. Dermatol.* **34**, e934–936.
102. Bremer J., van der Heijden E.H., Eichhorn D.S., Meijer R., Lemmink H.H., Scheffer H., Sinke R.J., Jonkman M.F., Pasmooij A.M.G., Van den Akker P.C. (2019) Natural exon skipping sets the stage for exon skipping as therapy for dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol. Therapy—Nucl. Acids.* **18**, 465–475.
103. Lim K.R.Q., Yoon C., Yokota T. (2018) Applications of CRISPR/Cas9 for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J. Personalized Med.* **8**, 38.
104. Vermeer F.C., Bremer J., Sietsma R.J., Sandilands A., Hickerson R.P., Bolling M.C., Pasmooij A.M.G., Lemmink H.H., Swertz M.A., Knoers N.V.A.M., van der Velde K.J., van den Akker P.C. (2021) Therapeutic prospects of exon skipping for epidermolysis bullosa. *Internat. J. Mol. Sci.* **22**, 12222.
105. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.-Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* **154**, 1380–1389.
106. Kocher T., Wagner R.N., Klausegger A., Guttmann-Gruber C., Hainzl S., Bauer J.W., Reichelt J., Koller U. (2019) Improved double-nicking strategies for COL7A1 editing by homologous recombination. *Mol. Therapy—Nucl. Acids.* **18**, 496–507.
107. Paquet D., Kwart D., Chen A., Sproul A., Jacob S., Teo S., Olsen K.M., Gregg A., Noggle S., Tessier-Lavigne M. (2016) Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature.* **533**, 125–129.
108. Zhang X., Jin H., Huang X., Chaurasiya B., Dong D., Shanley T.P., Zhao Y.-Y. (2022) Robust genome editing in adult vascular endothelium by nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 plasmid DNA. *Cell Rept.* **38**, 110196.
109. Huang T.P., Newby G.A., Liu D.R. (2021) Precision genome editing using cytosine and adenine base editors in mammalian cells. *Nat. Protocols.* **16**, 1089–1128.
110. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. (2017) Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature.* **551**, 464–471.
111. Rees H.A., Komor A.C., Yeh W.-H., Caetano-Lopes J., Warman M., Edge A.S.B., Liu D.R. (2017) Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nat. Commun.* **8**, 15790.
112. Osborn M.J., Newby G.A., McElroy A.N., Knipping F., Nielsen S.C., Riddle M.J., Xia L., Chen W., Eide C.R., Webber B.R., Wandall H.H., Dabelsteen S., Blazar B.R., Liu D.R., Tolar J. (2020) Base editor correction of COL7A1 in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patient-derived fibroblasts and iPSCs. *J. Invest. Dermatol.* **140**, 338–347.e5.
113. Doman J.L., Raguram A., Newby G.A., Liu D.R. (2020) Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. *Nat. Biotechnol.* **38**, 620–628.

114. Bowden A.R., Morales-Juarez D.A., Sczaniecka-Clift M., Agudo M.M., Lukashchuk N., Thomas J.C., Jackson S.P. (2020) Parallel CRISPR-Cas9 screens clarify impacts of p53 on screen performance. *eLife*. **9**, e55325.
115. Fu X., Wu S., Li B., Xu Y., Liu J. (2020) Functions of p53 in pluripotent stem cells. *Protein Cell*. **11**, 71–78.
116. Ihry R.J., Worringer K.A., Salick M.R., Frias E., Ho D., Theriault K., Kommineni S., Chen J., Sondey M., Ye C., Randhawa R., Kulkarni T., Yang Z., McAllister G., Russ C., Reece-Hoyes J., Forrester W., Hoffman G.R., Dolmetsch R., Kaykas A. (2018) p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **24**, 939–946.
117. Allen F., Crepaldi L., Alsinet C., Strong A.J., Kleshchevnikov V., De Angeli P., Páleníková P., Khodak A., Kiselev V., Kosicki M., Bassett A.R., Harding H., Galanty Y., Muñoz-Martínez F., Metzakopian E., Jackson S.P., Parts L. (2019) Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nat. Biotechnol.* **37**, 64–72.
118. Chakrabarti A.M., Henser-Brownhill T., Monserrat J., Poetsch A.R., Luscombe N.M., Scaffidi P. (2019) Target-specific precision of CRISPR-mediated genome editing. *Mol. Cell*. **73**, 699–713.e6.
119. Shen M.W., Arbab M., Hsu J.Y., Worstell D., Culbertson S.J., Krabbe O., Cassa C.A., Liu D.R., Gifford D.K., Sherwood R.I. (2018) Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. *Nature*. **563**, 646–651.
120. Bae S., Kweon J., Kim H.S., Kim J.-S. (2014) Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nat. Methods*. **11**, 705–706.
121. Tatioussian K.J., Clark R.D.E., Huang C., Thornton M.E., Grubbs B.H., Cannon P.M. (2021) Rational selection of CRISPR-Cas9 guide RNAs for homology-directed genome editing. *Mol. Therapy*. **29**, 1057–1069.
122. Kim S.-I., Matsumoto T., Kagawa H., Nakamura M., Hirohata R., Ueno A., Ohishi M., Sakuma T., Soga T., Yamamoto T., Woltjen K. (2018) Microhomology-assisted scarless genome editing in human iPSCs. *Nat. Commun.* **9**, 939.
123. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M., Chen P.J., Wilson C., Newby G.A., Raguram A., Liu D.R. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*. **576**, 149–157.
124. Hsu J.Y., Grünwald J., Szalay R., Shih J., Anzalone A.V., Lam K.C., Shen M.W., Petri K., Liu D.R., Joung J.K., Pinello L. (2021) PrimeDesign software for rapid and simplified design of prime editing guide RNAs. *Nat. Commun.* **12**, 1034.
125. Renz P., Imahorn E., Spoerri I., Aushev M., March O.P., Wariwoda H., Von Arb S., Volz A., Itin P.H., Reichelt J., Burger B. (2019) Arginine- but not alanine-rich carboxy-termini trigger nuclear translocation of mutant keratin 10 in ichthyosis with confetti. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 8442–8452.
126. Garcia T.M., Kiener S., Jagannathan V., Russell D.S., Leeb T. (2020) A COL7A1 variant in a litter of neonatal Basset Hounds with dystrophic epidermolysis bullosa. *Genes*. **11**, E1458.
127. Niskanen J., Dillard K., Arumilli M., Salmela E., Anttila M., Lohi H., Hytönen M.K. (2017) Nonsense variant in *COL7A1* causes recessive dystrophic epidermolysis bullosa in Central Asian Shepherd dogs. *PLoS One*. **12**, e0177527.
128. Pausch H., Ammermüller S., Wurmser C., Hamann H., Tetens J., Drögemüller C., Fries R. (2016) A nonsense mutation in the *COL7A1* gene causes epidermolysis bullosa in Vorderwald cattle. *BMC Genet.* **17**, 149.
129. Ding B., Ryder O.A., Wang X., Bai S.C., Zhou S.Q., Zhang Y. (2000) Molecular basis of albinism in the rhesus monkey. *Mutat. Res.* **449**, 1–6.
130. Johnson A.L., Peterson S.M., Terry M.M.L., Ferguson B., Colgin L.M., Lewis A.D. (2020) Spontaneous *KRT5* gene mutation in rhesus macaques (*Macaca mulatta*): a novel nonhuman primate model of epidermolysis bullosa simplex. *Veterinary Pathol.* **57**, 344–348.
131. Heinonen S., Männikkö M., Klement J.F., Whitaker-Menezes D., Murphy G.F., Uitto J. (1999) Targeted inactivation of the type VII collagen gene (*Col7A1*) in mice results in severe blistering phenotype: a model for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Cell Sci.* **112**(Pt 21), 3641–3648.
132. Fritsch A., Loeckermann S., Kern J.S., Braun A., Bösl M.R., Bley T.A., Schumann H., von Elverfeldt D., Paul D., Erlacher M., Berens von Rautenfeld D., Hausser I., Fässler R., Bruckner-Tuderman L. (2008) A hypomorphic mouse model of dystrophic epidermolysis bullosa reveals mechanisms of disease and response to fibroblast therapy. *J. Clin. Invest.* **118**, 1669–1679.
133. Kühl T., Mezger M., Hausser I., Guey L.T., Handgretinger R., Bruckner-Tuderman L., Nyström A. (2016) Collagen VII half-life at the dermal-epidermal junction zone: implications for mechanisms and therapy of genodermatoses. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 1116–1123.
134. Hou Y., Guey L.T., Wu T., Gao R., Cogan J., Wang X., Hong E., Vivian Ning W., Keene D., Liu N., Huang Y., Kaftan C., Tangarone B., Quinones-Garcia I., Uitto J., Francone O.L., Woodley D.T., Chen M. (2015) Intravenously administered recombinant human type VII collagen derived from chinese hamster ovary cells reverses the disease phenotype in recessive dystrophic epidermolysis bullosa mice. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 3060–3067.
135. Nyström A., Velati D., Mittapalli V.R., Fritsch A., Kern J.S., Bruckner-Tuderman L. (2013) Collagen VII plays a dual role in wound healing. *J. Clin. Invest.* **123**, 3498–3509.
136. Nishie W., Sawamura D., Goto M., Ito K., Shibaki A., McMillan J.R., Sakai K., Nakamura H., Olasz E., Yancey K.B., Akiyama M., Shimizu H. (2007) Humanization of autoantigen. *Nat. Med.* **13**, 378–383.
137. Luan X.-R., Chen X.-L., Tang Y.-X., Zhang J.-Y., Gao X., Ke H.-P., Lin Z.-Y., Zhang X.-N. (2018) CRISPR/Cas9-mediated treatment ameliorates the phenotype of epidermolytic palmoplantar keratoderma-like mouse. *Mol. Ther.—Nucl. Acids*. **12**, 220–228.

GENOME EDITING IN THERAPY OF GENODERMATOSES**A. V. Ivanenko¹, N. A. Evtushenko¹, and N. G. Gurskaya^{1, *}**¹*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia***e-mail: ngurskaya@mail.ru*

This review is devoted to the prospects for the use of fundamentally important approaches and methods for the correction and therapy of genodermatoses, a group of inherited skin diseases. The greatest number of methods was applicable for the group of inherited epidermolysis bullosa. Gene replacement using viral and non-viral methods of delivery to cells has been replaced by genome editing using programmable nucleases used both *in vitro* and *in vivo*. The focus is on more widely used methods applied *in vitro* to various cell types. The description of the methods used is classified based on the use of DNA break repair pathways: the canonical non-homologous end-reconnection pathway – cNHEJ, and directed homologous recombination – HDR. The choice of editing strategy depends on the type of mutation causing the disease, the type of its inheritance, and the nucleotide environment of the mutation. Animal disease models obtained by genome editing are considered. The experience of developing methods for editing the genome and their application for the treatment of genodermatoses, previously recognized as incurable, is summarized.

Keywords: genodermatoses, inherited epidermolysis bullosa, dominant mutation, recessive mutation, epidermal keratinocytes, induced pluripotent stem cells, programmable nucleases, genome editing, repair, recombination, transgenic cells, gene therapy, transplantation

УДК 577.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АКТИВАЦИИ ГЕНОВ ПРИ ПОМОЩИ СИСТЕМ ТРАНСАКТИВАЦИИ НА ОСНОВЕ CRISPR/dCas9 ЗАВИСИТ ОТ ВРЕМЕНИ РАБОТЫ СИСТЕМЫ

© 2022 г. А. С. Артюхов^a, Д. А. Доровский^b, А. В. Сорокина^a, К. М. Шакирова^a,
Е. Д. Момотюк^{a, c}, Э. Б. Дашинимаев^{a, b, *}

^aЦентр высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

^bМосковский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

^cИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: dashinimaev@gmail.com

Поступила в редакцию 13.05.2022 г.

После доработки 06.06.2022 г.

Принята к публикации 06.06.2022 г.

Одно из перспективных приложений, возникших на основе системы CRISPR/Cas9, — активаторные системы, которые позволяют прицельно управлять уровнем экспрессии генов интереса в исследуемых клетках. Однако по имеющимся данным эффективность их работы может значительно изменяться в зависимости от типа клеток и используемой активаторной системы. Мы сравнили эффективность трех активаторных систем: dCas9-VP160, dCas9-SunTag и dCas9-VPR — в линии иммортализованных фибробластов кожи человека для активации экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *PDX1*, *FOXA2*, *NKX2-2*, *NKX6-1*. Показано, что эффективность активации этих генов действительно зависит от типа активаторной системы, а сила активации — от времени работы активаторной системы.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, активация, dCas9-VP160, dCas9-SunTag, dCas9-VPR

DOI: 10.31857/S0026898422060052

ВВЕДЕНИЕ

Знаменитая система редактирования генома CRISPR/Cas9 послужила основой для широкого спектра молекулярно-биологических методов и приложений [1]. Помимо классического редактирования генома, возникли методы, использующие способность системы CRISPR/Cas9 целенаправленно взаимодействовать с выбранными участками геномной ДНК. Белок dCas9 (деактивированная форма белка Cas9) может быть соединен с различными функциональными белками, такими как активаторы (или репрессоры) транскрипции. Таким образом, используя гидовые РНК, комплементарные к промоторным областям генов интереса, можно изменять уровень экспрессии этих генов, активировать их, если они подавлены, и наоборот [2]. По-прежнему преимущество данных систем — их модульность, гибкость и мультиплексность, поскольку замену гидовых РНК (т.е. перенацеливание системы) осуществить просто и в одну клетку можно доставлять несколько их вариантов для активации нескольких генов одновременно.

Перечисленные свойства потенциально делают такие системы мощным инструментом для исследования клеточной пластичности, процессов репрограммирования клеток и выяснения роли исследуемых генов в подобных процессах. Отдельно стоит отметить, что, например, активация экспрессии гена путем воздействия на его промотор позволяет запустить “естественную” экспрессию нескольких различных изоформ мРНК, в то время как часто используемая для таких целей вирусная трансдукция рекомбинантного трансгена позволяет экспрессировать лишь одну изоформу.

Потенциальной проблемой для работы активаторных систем могут быть различия в структуре хроматина и доступности промоторных участков генов интереса в клетках разных типов. Так, легко предположить, что активация генов, отвечающих за терминальную нейрональную дифференцировку, будет происходить легче в нейтральных стволовых клетках, в то время как активация таких генов в фибробластах кожи может быть менее эффективна. Вместе с тем, отдельный вопрос, требующий изучения, — сила активации подобных активаторных систем. Например, известно,

что лентивирусная трансдукция, в случае использования конститутивного сильного промотора, позволяет запустить экспрессию трансгена в десятки тысяч раз сильнее фоновой экспрессии. В то же время заранее неизвестно, во сколько раз удастся увеличить уровень экспрессии генов интереса с помощью активаторных систем, а также будет ли такое увеличение экспрессии достаточным или избыточным для изучаемого биологического процесса.

В данной работе мы рассмотрели три разных активаторных системы на основе CRISPR/dCas9: dCas9-VP160, dCas9-SunTag и dCas9-VPR. Сравнили их эффективность, а также изучили, как влияет на эффективность работы системы dCas9-VPR длительность эксперимента. С этой целью мы получили три клеточные линии иммортализованных фибробластов, постоянно экспрессирующие компоненты соответствующих активаторных систем. Затем сравнили эффективность работы этих систем на примере трех транскрипционных факторов: *PDX1*, *OCT4*, *NANOG* – и выбрали наиболее эффективную систему. После этого мы активировали экспрессию транскрипционных факторов: *PDX1*, *NKX2-2*, *NKX6-1*, *FOXA2*, *OCT4*, *NANOG* и измерили уровень их экспрессии на 7, 14 и 28 сутки культивирования после трансфекции соответствующих геновых РНК. Нам удалось установить, что системы dCas9-VPR и dCas9-SunTag значительно эффективней dCas9-VP160. Также оказалось, что уровень экспрессии всех активируемых генов, рассмотренных в этой статье, сильно зависит от длительности эксперимента, повышаясь при увеличении времени культивирования. Максимальный уровень экспрессии каждого из рассмотренных генов также значительно варьирует.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. В данной работе использована иммортализованная линия фибробластов кожи человека 1608. Эта клеточная линия получена из первичных фибробластов кожи введением в них гена каталитического компонента теломеразы (ген *TERT*). Клеточная линия любезно предоставлена Е.Е. Егоровым (ИМБ РАН им. Энгельгардта, Москва, Россия) [3]. При пассировании клеток использовали 0.05% Трипсин-EDTA (“Life Technologies”, США). Клетки культивировали в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия) с 10%-ной фетальной телячьей сывороткой (“Cargilorn”, Германия) при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности.

Лентивирусная трансдукция. Лентивирусные частицы упаковывали с использованием системы третьего поколения (“Invitrogen”, США) в клетки HEK293TN. Клетки HEK293TN высевали за сутки до трансфекции в количестве 600 тыс. клеток

на чашку Петри диаметром 6 см, затем проводили трансфекцию коктейлем плазмид (вектор интереса + 3 упаковочные плазмиды) при помощи PEI (Polyethylenimine, линейная форма; “Sigma”, США) в соотношении 6 мкл PEI (стоковый раствор 6 мкг/мл) + 6 мкг плазмидной ДНК, в 100 мкл OPTI-MEM (“Gibco”, США). Трансфекционную смесь добавляли к клеткам, затем через 4–6 ч проводили смену среды на свежую. С этого момента шло накопление вирусных частиц; через 72 ч среду с лентивирусными частицами собирали, осветляли центрифугированием 200 g, 5 мин, при комнатной температуре и фильтровали через поры 0.45 мкм. Полученный вирусный супернатант добавляли к клеткам-мишеням на одну ночь в присутствии полибрена (конечная концентрация 5 мкг/мл), на следующий день заменяли среду на свежую. Экспрессия трансгена выходила на постоянный уровень примерно через 48–72 ч.

Лентивирусные конструкции для экспрессии компонентов систем трансактивации. Вектор для экспрессии системы dCas9-VP160 сконструировали на основе вектора pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression (Addgene plasmid #48240; <http://n2t.net/addgene:48240>; RRID: Addgene_48240) [4], который был любезно предоставлен Rudolf Jaenisch. С этой целью в компании Евроген (ООО “Евроген”, Москва, Россия), последовательность гена dCas9-VP160 переклонировали в вектор для лентивирусной трансдукции pLVТ.

Векторы для экспрессии системы dCas9-SunTag – pHR-TRE3G-dCas9-10XGCN4-P2A-mCherry (Addgene plasmid #122132; <http://n2t.net/addgene:122132>) и pHR-PGK-scFvGCN4-sfGFP-VP64 (Addgene plasmid #122133; <http://n2t.net/addgene:122133>) – любезно предоставлены Stanley Qi [5]. Вектор для экспрессии системы dCas9-VPR – lenti-EF1a-dCas9-VPR-Puro (Addgene plasmid #99373; <http://n2t.net/addgene:99373>) – любезно предоставлен Kristen Brennand [6].

Подбор и клонирование геновых РНК. Последовательности геновых РНК, нацеленные на промоторы различных генов для активации их экспрессии, представлены в табл. 1. Последовательности геновых РНК для активации генов *OCT4* и *NANOG* взяты из статьи Weltner с соавт. [7], последовательности остальных геновых РНК подобраны при помощи ресурсов EPD (Eukaryotic Promoter Database, <https://epd.epfl.ch>), ENSEMBL.ORG, CRISPOR.TEFOR.NET.

Олигонуклеотиды, кодирующие варибельную часть геновых РНК, синтезированы в компании “Евроген”. Данные олигонуклеотиды фосфорилированы полинуклеотидкиназой T4 (“NEB”, США) согласно инструкции производителя и затем лигированы в линеаризованный вектор pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP с помощью ДНК лигазы T7 (“NEB”). Вектор (Addgene plasmid # 57823;

<http://n2t.net/addgene:57823>) [8] любезно предоставлен доктором Benjamin Ebert.

Выделение РНК и обратная транскрипция. Клетки снимали с культурального пластика и собирали центрифугированием. Тотальную РНК выделяли с помощью набора ExtractRNA (“Евроген”). Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра Implen P360 nanodrop system. Для приготовления раствора кДНК отбирали 1 мкг тотальной РНК и обрабатывали ДНКазой (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно инструкции производителя. Первую цепь кДНК синтезировали с помощью набора MMLV kit (“Евроген”) с использованием олиго-dT праймеров. Обратную транскрипцию проводили в течение 1 ч при 37°C и 10 мин при 70°C для остановки реакции.

Количественная ПЦР. Количественную ПЦР проводили с использованием амплификатора CFX96 (“Bio-Rad”, США). Температурный профиль реакции: 1) 95°C, 10 мин; 2) 40 циклов: 95°C, 15 с и 60°C 1 мин; 3) построение кривой плавления в диапазоне от 60 до 95°C. Для приготовления реакционных смесей использовали готовую ПЦР-смесь HS-SYBR (“Евроген”). Для нормирования результатов использовали следующие гены: *C1orf43* и *REEP5*. Выбор референтных генов проведен с помощью программы *geNorm*. Список использованных праймеров представлен в табл. 2. Для расчетов относительных уровней экспрессии использовали $\Delta\Delta C_T$ метод.

Иммуноцитохимия. Перед окрашиванием клетки отмывали в PBS и фиксировали в течение 15 мин в 4%-ном растворе параформальдегида при комнатной температуре. Затем их аккуратно промывали в том же буфере еще три раза (по 5 мин при комнатной температуре). Клетки инкубировали в растворе первичных антител (анти-Cas9, “Thermo Fisher Scientific”, cat# MA5-23519) в блок-растворе (10% FBS и 0.1% Triton-X-100 в PBS) в течение 16–18 ч при 4°C, снова промывали 3 раза и инкубировали в растворе вторичных антител (Alexa Fluor 488 или Alexa Fluor 594 (“Thermo Fisher Scientific”) в блок-растворе в течение 1 ч при 37°C. Затем клеточные ядра окрашивали DAPI (“Thermo Fisher Scientific”) (1 мг/мл в PBS). Снимки образцов получали с помощью флуоресцентного микроскопа EVOS FL AUTO (Life Technologies, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение клеточных линий, постоянно экспрессирующих компоненты активаторных систем

Нами использована линия иммортализованных фибробластов кожи человека 1608hT [3]. Получены три линии клеток, постоянно экспресси-

Таблица 1. Последовательности гидовых РНК

| Целевой ген | Последовательность, 5'→3' |
|---------------|---------------------------|
| <i>OCT4</i> | GGGGGGAGAACTGAGGCGA |
| <i>NANOG</i> | GCGCCAGGAGGGGTGGGTCTA |
| <i>PDX1</i> | GCCGCACCATAGGCTCCGCG |
| <i>NKX2-2</i> | GCCTTATATGGACTGATCGCT |
| | GTGTGGACTCGCGAGCGACG |
| <i>NKX6-1</i> | GTCTAGGACTCGCGGAACGAA |
| | GCTCTGCTCTTTCGGTCGCG |
| <i>FOXA2</i> | GGAGGAGGAGGTGTGGACCG |
| | GTGCCAACCTCAGCCGCCACC |

Таблица 2. Использованные праймеры

| Ген | Последовательность, 5'→3' |
|----------------|--|
| <i>C1orf43</i> | ACGCCTTTCAAGGGTGTACG CAAAGACCCCTGTCCCATAGC |
| <i>REEP5</i> | ACTGCATGACTGACCTTCTGG AGTCCGATGACACCAAGAGC |
| <i>OCT4</i> | ACCCACACTGCAGCAGATCA CACACTCGGACCACATCCTTCT |
| <i>NANOG</i> | GTCTCGTATTTGCTGCATCGT AACACTCGGTGAAATCAGGGT |
| <i>PDX1</i> | CCCTGGGTGACCACTAAACC CACAGCCTCTACCTCGGAAC |
| <i>NKX2-2</i> | CAATGACAAGGAGACCCCGG GAAAAGCACTCGCCGCTTTC |
| <i>NKX6-1</i> | CGTTGGGGATGACAGAGAGT CGAGTCCTGCTTCTTCTTGG |
| <i>FOXA2</i> | GTGAAATCCAGGTCTCGGGT GCCCTTGCAGCCAGAATACA |

рующих компоненты трех активаторных систем: dCas9-VP160, dCas9-SunTag и dCas9-VPR, – с помощью лентивирусной трансфекции соответствующих векторов [4–6]. Клеточные линии названы 1608-VP160, 1608-SunTag и 1608-VPR соответственно. Мы проверили наличие экспрессии компонентов активаторных систем с помощью иммуноцитохимической окраски полученных клеточных линий антителами против Cas9. Результаты представлены на рис. 1. Окраска на Cas9 показала корректную локализацию преимущественно в ядрах окрашенных клеток. Таким образом мы подтвердили, что компоненты активаторных систем экспрессируются в полученных клеточных линиях.

Сравнение активаторных систем

Сравнивая три рассматриваемые активаторные системы, мы использовали гидовые РНК, комплементарные промоторам генов *OCT4*, *NANOG* и *PDX1*. Гены *OCT4* и *NANOG* – одни из

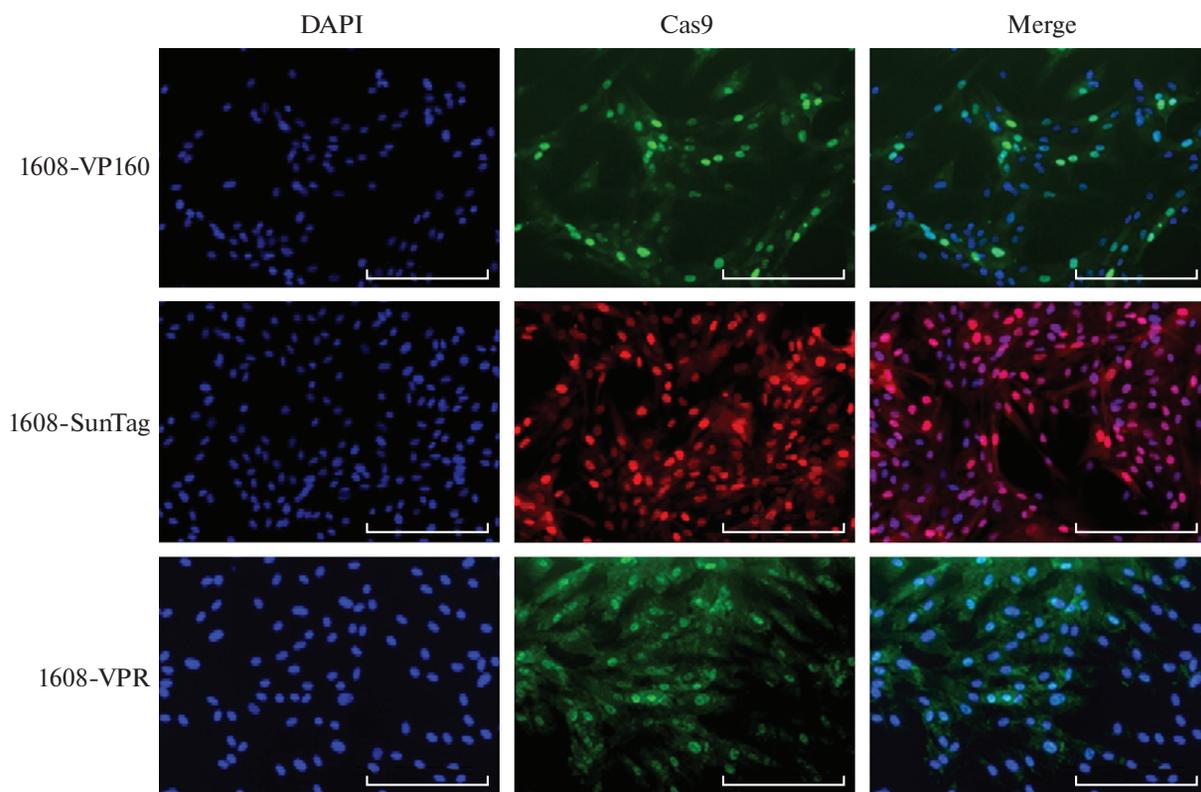


Рис. 1. Окраска антителами против белка Cas9 клеточных линий, в которые трансдуцированы компоненты активаторных систем dCas9-VP160, dCas9-SunTag, dCas9-VPR. Как видно, белок dCas9 локализован в ядрах клеток, — следовательно, компоненты активаторных систем успешно экспрессируются. Флуоресцентная микроскопия, размер шкалы — 200 мкм.

ключевых транскрипционных факторов поддержания плюрипотентности в эмбриональных стволовых клетках, а ген *PDX1* — ключевой транскрипционный фактор продуцирующих инсулин бета-клеток поджелудочной железы. Данные гены не экспрессируются (либо экспрессируются на крайне низком уровне единичных транскриптов) в фибробластах кожи человека. Далее при помощи лентивирусной трансдукции мы доставили в клетки линий 1608-VP160, 1608-SunTag и 1608-VPR несколько гидовых РНК для активации целевых генов. Трансдукцию проводили для каждой гидовой РНК по отдельности. В то же время каждую клеточную линию трансдуцировали лентивирусом, кодирующим гидовую РНК, не имеющую мишени в геноме человека (no target gRNA, NTC-gRNA), и такие клеточные линии использовали в качестве контроля сравнения. Через семь суток после трансдукции из полученных клеток выделили тотальную РНК и измерили уровни экспрессии генов *OCT4*, *NANOG* и *PDX1* методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Далее уровни экспрессии откалибровали по контрольному образцу NTC-gRNA, для каждой точки эксперимента сделаны независимые биологические повторы, результат по которым усредняли. Ре-

зультаты эксперимента представлены на рис. 2. В целом, нам удалось зафиксировать значимую достоверную активацию экспрессии исследуемых генов. В среднем уровень экспрессии рассмотренных генов повысился в 3.8 раза для dCas9-VPR, 3.9 раза для dCas9-SunTag и 1.2 раза для dCas9-VP160. На основе полученных данных сделан вывод о том, что активаторные системы dCas9-SunTag и dCas9-VPR (второго поколения) работают эффективней, чем dCas9-VP160 (первого поколения). В целом данный факт согласуется с опубликованными ранее результатами [2].

Исследование эффективности активаторной системы dCas9-VPR в зависимости от времени культивирования

Сравнив эффективность работы активаторных систем в доступных нам условиях, для дальнейших экспериментов мы выбрали систему dCas9-VPR. Несмотря на то, что данная система показала сравнимую эффективность с системой dCas9-SunTag, мы решили использовать dCas9-VPR ввиду более простых технических нюансов при работе с линией (поддержание постоянной экспрессии всего одного трансгена, в то время как dCas9-SunTag

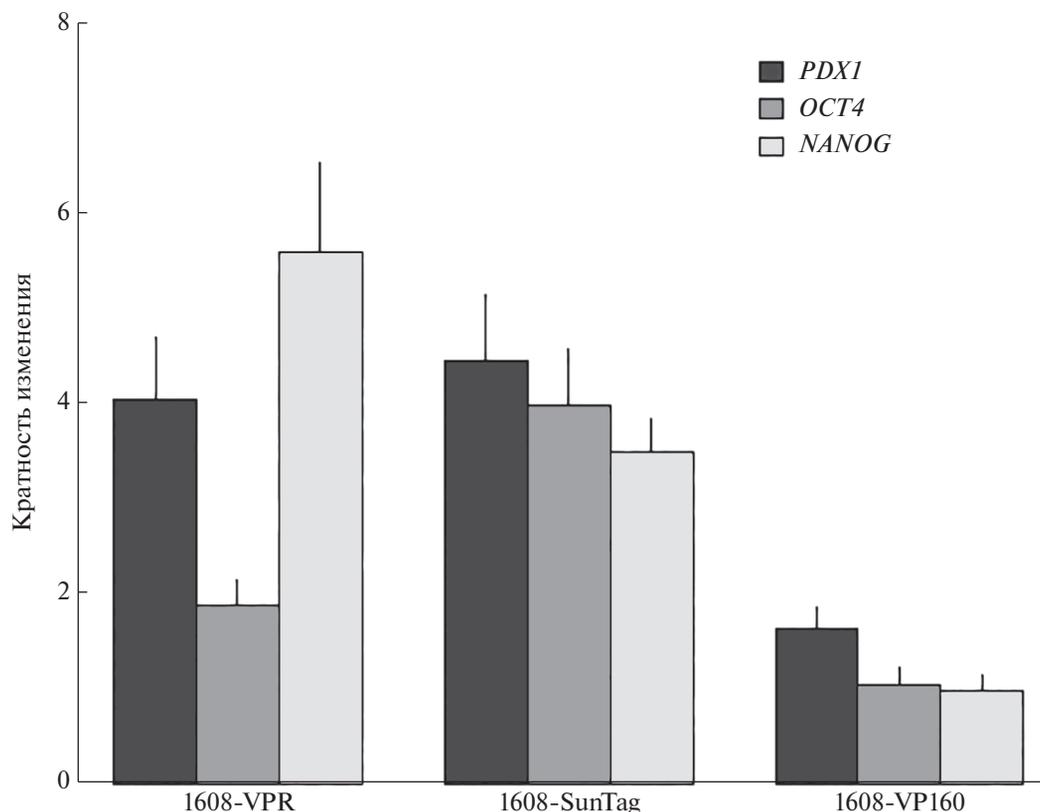


Рис. 2. Сравнение эффективности активаторных систем dCas9-VPR, dCas9-SunTag, dCas9-VP160. Уровни экспрессии генов *PDX1*, *OCT4* и *NANOG* в клеточных линиях 1608-VPR, 1608-SunTag и 1608-VP160 через 7 суток после трансдукции лентивирусами, кодирующими гидовые РНК к генам *PDX1*, *OCT4* и *NANOG*. Уровни экспрессии откалиброваны по таковой в образцах, трансдуцированных конструкцией, кодирующей безтаргетную гидовую РНК NTC-gRNA. Бары обозначают стандартное отклонение, каждое измерение проведено в трех технических и двух независимых биологических повторах.

требует поддержания экспрессия двух трансгенов, а также “забывает” два флуоресцентных канала). Поскольку уровень активации в предыдущем эксперименте был недостаточно сильным по сравнению с литературными данными, мы решили проверить, как меняется уровень экспрессии активируемых генов с течением времени. Для этого использовали гидовые РНК, нацеленные на промоторы генов *OCT4*, *NANOG*, *PDX1*, *NKX2-2*, *NKX6-1* и *FOXA2*. Клетки линии 1608-VPR трансдуцировали лентивирусами, кодирующими гидовые РНК к вышеперечисленным генам, и NTC-gRNA. Клетки культивировали и выделяли из них тотальную РНК на 7, 14 и 28 суток после трансдукции. Уровень экспрессии активируемого гена оценивали при помощи количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни экспрессии откалибровали по контрольному образцу NTC-gRNA, для каждой точки эксперимента провели независимые биологические повторы и результат усредняли. Результаты эксперимента представлены на рис. 3. Мы наблюдали значительное достоверное повышение уровней экспрессии активируемых генов с течением времени.

Наиболее сильно возросла экспрессия гена *FOXA2* (примерно в 100, 1000 и 5000 раз на 7, 14 и 28 сутки после трансдукции соответственно). Наиболее слабое увеличение экспрессии наблюдали для *OCT4* (примерно в 21 раз на 28 сут после трансдукции). В среднем уровни экспрессии активируемых генов повысились в 30, 240 и 960 раз на 7, 14 и 28 сутки эксперимента. Довольно широкий разброс результатов между генами может быть объяснен разным “качеством” гидовых РНК, особенностями используемой клеточной культуры, такими как доступность промоторных участков целевых генов для гидовых РНК и исходным уровнем экспрессии этих генов, а также особенностями регуляции экспрессии активируемых генов в фибробластах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнив эффективность активационных систем dCas9-VPR, dCas9-SunTag и dCas9-VP160 в фибробластах кожи человека на примере генов *PDX1*, *OCT4* и *NANOG*, мы установили, что в среднем уровень экспрессии рассмотренных генов

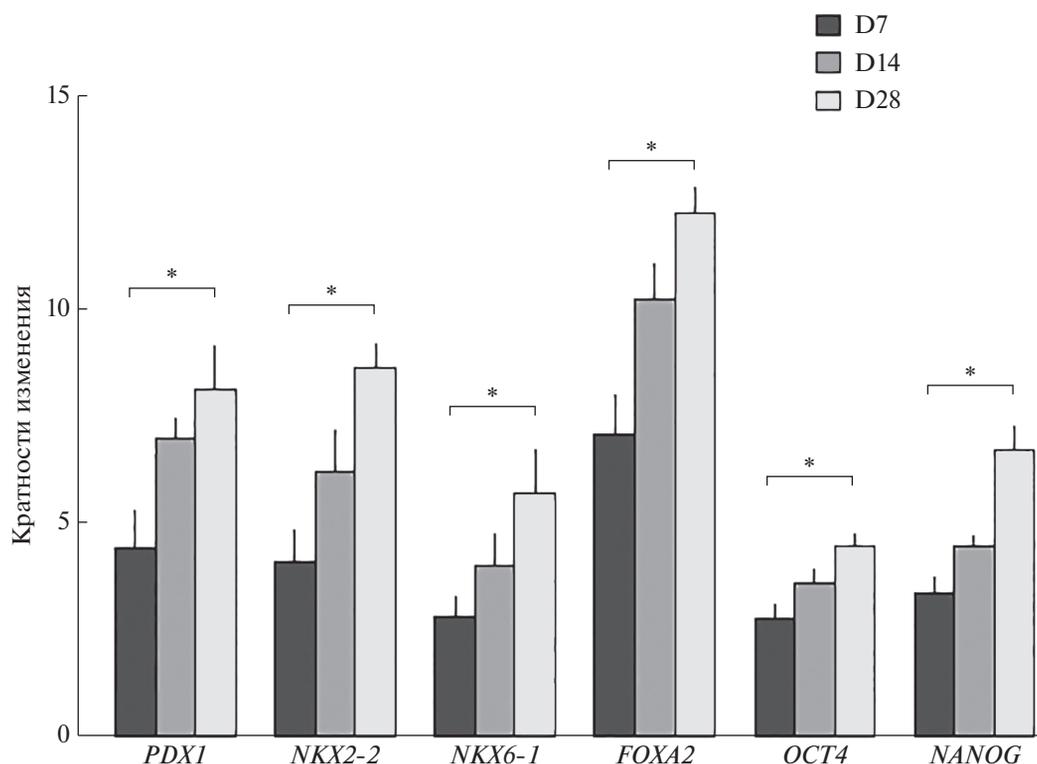


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии активируемых генов в клеточной линии 1608-VPR в зависимости от времени после трансфекции гидовых РНК. Уровни экспрессии измерены на 7, 14 и 28 сутки после трансдукции гидовых РНК. Уровни экспрессии откалиброваны по уровню экспрессии в образцах, трансдуцированных конструкцией, кодирующей безтаргетную гидовую РНК NTC-gRNA. Как можно видеть, экспрессия каждого из генов достоверно значительно возрастает с течением времени культивирования. Бары обозначают стандартное отклонение, каждое измерение проведено в трех технических и двух независимых биологических повторах. * Обозначает достоверное отличие (p -value < 0.05) согласно t -критерию Стьюдента.

выше в 3.8, 3.9 и 1.2 раза для dCas9-VPR, dCas9-SunTag и dCas9-VP160 соответственно, что указывает на превосходство систем активации второго поколения по сравнению с системами первого. Полученные нами результаты идентичны уже опубликованным данным других исследовательских групп. Так, группа исследователей под руководством Tanenbaum M.E., разработавшая систему dCas9-SunTag, провела сравнение эффективности своей системы с системой dCas9-VP64 (система первого поколения, практически аналог dCas9-VP160) на примере активации гена *CDKN1B* в клеточной линии HEK293. Они обнаружили, что уровень экспрессии *CDKN1B* повышался более чем в 3 раза и менее чем в 1.5 раза для систем dCas9-SunTag и dCas9-VP64 соответственно [9]. Исследователи во главе с Blanchofort P. использовали систему dCas9-VPR для активации опухолевого супрессора *PTEN* в клеточных линиях меланомы SK-MEL28 и рака молочной железы SUM159. Через двое суток после трансфекции гидовых РНК уровень экспрессии *PTEN* вырос в 3 и 2.5 раза в соответствующих клеточных линиях [10]. В работе Xi H. с соавт. [11] экспрессия *PAX7* в

плюрипотентных клетках человека повысилась в 8 раз с помощью dCas9-VPR на вторые сутки после трансфекции гидовых РНК. Однако более интересные результаты представлены группой под руководством Church G.M., разработавшей систему dCas9-VPR. Они сравнили свою систему и dCas9-VP64, используя гидовые РНК к генам, участвующим в нейтральной дифференцировке, в плюрипотентных клетках человека и линии HEK293. Оказалось, что система dCas9-VPR примерно в 80 раз эффективней в HEK293 и в 15 раз – в плюрипотентных клетках, чем dCas9-VP64 [12]. Кроме того, установлено, что в клетках HEK293 экспрессия *NEUROD1* возрастала в 87 раз, в то время как *ASCL1* – в 4600 раз. Таким образом, можно прийти к заключению, что эффективность активации генов интереса зависит как от системы активации, так и от особенностей используемого типа клеток. Возможным объяснением таких различий могут служить профили конденсации хроматина и метилирования промоторов активируемых генов, а также регулирование экспрессии генов интереса со стороны различных тран-

скрипционных факторов в конкретной клеточной культуре.

Еще один фактор, влияющий на эффективность активации генов интереса — подбор гидовых РНК к промоторам этих генов. Задача определения оптимального участка промотора, как и картирование промоторов, для определения оптимального сайта связывания гидовых РНК полностью не решена в настоящий момент. Существует две стратегии для решения этой задачи. Первая состоит в подборе одновременно нескольких гидовых РНК к одному промотору (как правило, до пяти на один промотор) и в сравнении их по отдельности с выбором в последующем наиболее эффективной. Эта величина для гидовых РНК может значительно отличаться. Так, в работе Liu P. с соавт. [13] обнаружено, что эффективность разных гидовых РНК для активации *SOX2* в линии эмбриональных фибробластов мыши MEF отличается в 3–5 раз. Похожие результаты получены группой Tanenbaum M.E. с соавт. [9] для гена *CDKN1B* в клеточной линии HEK293, группой Hoogewijs D. с соавт. [14] для гена *ADGB* в линиях HEK293 и MCF7, а также группой Pyle A.D. с соавт. [11] для гена *PAX7* в плюрипотентных клетках. Второй стратегией может служить подбор несколько гидовых РНК и доставка в клеточную культуру их эквимоллярной смеси. Такой подход позволяет сэкономить ресурсы на проверке каждой гидовой РНК по отдельности, однако может приводить к снижению эффективности активации в целом в культуре (поскольку доля эффективных гидовых РНК будет снижена за счет присутствия неэффективных РНК). С другой стороны, в случае, если внутри клетки оказывается несколько гидовых РНК, которые садятся на разные участки промотора, можно надеяться на возникновение кумулятивного синергетического эффекта и кратного повышения эффективности работы системы.

Мы использовали гидовые РНК к *OCT4* и *NANOG*, эффективность которых подтверждена в работе Weltner с соавт. [7], а также подобранными самостоятельно гидовыми РНК к генам *PDX1*, *NKX2-2*, *NKX6-1* и *FOXA2*. В случае генов *NKX2-2*, *NKX6-1* и *FOXA2* применяли по две гидовых РНК в эквимоллярной смеси. Наблюдаемые значительные различия в эффективности активации рассматриваемых генов (от 6 раз для *OCT4* и 20 раз для *PDX1* на 7 сут после трансдукции) обусловлены, по всей видимости, как качеством гидовых РНК, так и особенностями использованной линии фибробластов кожи человека. Несмотря на то, что полученные результаты свидетельствуют о достоверно различимом эффекте активации экспрессии, этот уровень вряд ли может быть использован для изучения процессов репрограммирования одного типа клеток в другой или изучения клеточной пластичности. Так, по некоторым

оценкам, для репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки уровень экспрессии мастер-генов должен возрасти более, чем в 1000 раз.

Низкая эффективность активации генов интереса также может быть объяснена недостатком компонентов активаторной системы и гидовых РНК или недоступностью сайтов связывания гидовых РНК с целевым промотором. В данной работе мы использовали клеточные культуры с постоянной экспрессией компонентов активаторных систем и лентивирусную доставку конструкций, кодирующих гидовые РНК. Такой подход позволяет обеспечивать избыток необходимых компонентов и устойчивую работу системы, поскольку, как показано группой Hoogewijs D. [14], изменение количества гидовой РНК и компонентов системы dCas9-VPR в широком диапазоне не приводит к кратному росту эффективности активации гена *ADGB* в линии HEK293. Вместе с тем, Liu P. с соавт. [13] установили, что с ростом продолжительности эксперимента с 4 до 12 суток, уровень экспрессии *OCT4* в клетках MEF возрастал в три раза, а экспрессия *SOX2* — в 5. Hu W. с соавт. [15] показали, что эффективность активации гена *FibH* в клетках VmE шелковичного червя возрастает в 10 раз при увеличении продолжительности эксперимента с 24 до 60 ч. Опираясь на эти данные, мы решили значительно продлить время эксперимента и проверить, как будут меняться уровни экспрессии активируемых генов в течение 28 суток после доставки гидовых РНК. Установлено, что экспрессия всех активируемых генов (*PDX1*, *OCT4*, *NANOG*, *NKX2-2*, *NKX6-1* и *FOXA2*) значительно возрастает на 7, 14 и 28 сутки культивирования; при этом в каждой временной точке наблюдали значительный разброс в эффективности активации генов интереса. Так, на 7 сутки эксперимента экспрессия усиливалась в 6–20 раз, а на 28 сутки — в 22–4000 раз. Заметим, что наибольшая эффективность активации достигнута для гена *FOXA2*, в то время как для остальных генов она варьировала от 22 до 398 раз на 28 сутки культивирования. Стоит отметить, что все активируемые гены — это гены транскрипционных факторов, не характерных для фибробластов, и можно предположить, что исследуемые промоторы расположены в областях компактного гетерохроматина. Мы полагаем, что возрастание их экспрессии с увеличением времени эксперимента можно объяснить пролиферацией клеток, так как процессы клеточного деления сопровождают циклы конденсации–деконденсации хроматина, что увеличивает доступность сайтов связывания гидовых РНК с целевыми промоторами. Широкий диапазон эффективности активации, по-видимому, связан также с регулированием экспрессии этих генов в использованной нами линии фибробластов. Например, ген *FOXA2* представляет собой “пионер-

ский” транскрипционный фактор, способный к самостоятельной модификации гистонов, ремоделированию хроматина и профиля метилирования [16, 17]. В то же время гены *PDX1*, *NKX2-2*, *NKX6-1*, *OCT4* и *NANOG* регулируются большим числом других транскрипционных факторов, отсутствие экспрессии которых в фибробластах может снижать эффективность их активации.

Таким образом, экспериментально подтверждено, что системы трансактивации второго поколения: dCas9-VPR и dCas9-SunTag – более эффективны, чем система первого поколения dCas9-VP160. Эффективность активации в одних и тех же клетках для разных генов разная, что, по всей видимости, происходит из-за совокупности факторов: качества гидовых РНК, выбора клеточной линии, особенностей эпигенетического ландшафта в конкретном биологическом контексте целевого промотора. Нам удалось подобрать несколько гидовых РНК и вызвать достоверную значимую активацию генов *FOXA2*, *PDX1*, *NKX2-2*, *NKX6-1*, являющихся ключевыми транскрипционными факторами продуцирующих инсулин клеток поджелудочной железы. Также экспериментально показана прямая зависимость степени активации целевых генов от времени работы системы, что, несомненно, необходимо учитывать при планировании экспериментов по репрограммированию клеток при помощи трансактиваторных систем на основе CRISPR/dCas9.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки (№ 075-15-2019-1789), выданного Центру высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Часть работы, связанная с иммунофлуоресцентной микроскопией, поддержана грантом РНФ (грант № 17-75-20178). Работа Артюхова А.С. поддержана грантом Systems Biology Fellowship от Сколковского института науки и технологий.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang H., Qin C., An C., Zheng X., Wen S., Chen W., Liu X., Lv Z., Yang P., Xu W., Gao W., Wu Y. (2021) Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Mol. Cancer*. **20**(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01431-6>
- Shakirova K.M., Ovchinnikova V.Y., Dashinimaev E.B. (2020) Cell reprogramming with CRISPR/Cas9 based transcriptional regulation systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 882. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00882>
- Egorov E.E., Terekhov S.M., Vishniakova Kh.S., Karachentsev D.N., Kazimirchuk E.V., Tsvetkova T.G., Veiko N.N., Smirnova T.D., Makarenkov A.S., El'darov M.A., Meshcheriakova Iu.A., Liapunova N.A., Zelenin A.V. (2003) Telomerization as a method of obtaining immortal human cells preserving normal properties. *Ontogenez*. **34**(3), 183–192 (in Russ.).
- Cheng A.W., Wang H., Yang H., Shi L., Katz Y., Theunissen T.W., Rangarajan S., Shivalila C.S., Dadon D.B., Jaenisch R. (2013) Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*. **23**(10), 1163–1171. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.122>
- Liu Y., Yu C., Daley T.P., Wang F., Cao W.S., Bhate S., Lin X., Still C. 2nd, Liu H., Zhao D., Wang H., Xie X.S., Ding S., Wong W.H., Wernig M., Qi L.S. (2018) CRISPR activation screens systematically identify factors that drive neuronal fate and reprogramming. *Cell Stem Cell*. **23**(5), 758–771.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.003>
- Ho S.M., Hartley B.J., Flaherty E., Rajarajan P., Abdelaal R., Obiorah I., Barretto N., Muhammad H., Phatnani H.P., Akbarian S., Brennand K.J. (2017) Evaluating synthetic activation and repression of neuropsychiatric-related genes in hiPSC-Derived NPCs, neurons, and astrocytes. *Stem Cell Rep*. **9**(2), 615–628. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.06.012>
- Weltner J., Balboa D., Katayama S., Bernal M., Krjutškov K., Jouhilahti E.M., Trokovic R., Kere J., Otonkoski T. (2018) Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators. *Nat. Commun.* **9**(1), 2643. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05067-x>
- Heckl D., Kowalczyk M.S., Yudovich D., Belizaire R., Puram R.V., McConkey M.E., Thielke A., Aster J.C., Regev A., Ebert B.L. (2014) Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat. Biotechnol.* **32**(9), 941–946. <https://doi.org/10.1038/nbt.2951>
- Tanenbaum M.E., Gilbert L.A., Qi L.S., Weissman J.S., Vale R.D. (2014) A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*. **159**(3), 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>
- Moses C., Nugent F., Waryah C.B., Garcia-Bloj B., Harvey A.R., Blancafort P. (2019) Activating PTEN tumor suppressor expression with the CRISPR/dCas9 system. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. **14**, 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.12.003>
- Xi H., Young C.S., Pyle A.D. (2020) Generation of PAX7 reporter cells to investigate skeletal myogenesis from human pluripotent stem cells. *STAR Protoc.* **1**(3), 100158. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100158>
- Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B.W., Tuttle M., Iyer P.R.E., Lin S., Kiani S., Guzman C.D., Wiegand D.J., Ter-Ovanesyan D., Braff J.L., Davidsohn N., Housden B.E., Perrimon N., Weiss R., Aach J., Collins J.J., Church G.M. (2015) Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming.

- Nat. Methods.* **12**(4), 326–328.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3312>
13. Liu P., Chen M., Liu Y., Qi L.S., Ding S. (2018) CRISPR-based chromatin remodeling of the endogenous Oct4 or Sox2 locus enables reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell.* **22**(2), 252–261.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.001>
 14. Koay T.W., Osterhof C., Orlando I.M.C., Keppner A., Andre D., Yousefian S., Suárez Alonso M., Correia M., Markworth R., Schödel J., Hankeln T., Hoogewijs D. (2021) Androglobin gene expression patterns and FOXJ1-dependent regulation indicate its functional association with ciliogenesis. *J. Biol. Chem.* **296**, 100291.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100291>
 15. Hu W., Wang X., Ma S., Peng Z., Cao Y., Xia Q. (2021) CRISPR-mediated endogenous activation of fibroin heavy chain gene triggers cellular stress responses in *Bombyx mori* embryonic cells. *Insects.* **12**(6), 552.
<https://doi.org/10.3390/insects12060552>
 16. Friedman J.R., Kaestner K.H. (2006) The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol. Life Sci.* **63**(19–20), 2317–2328.
<https://doi.org/10.1007/s00018-006-6095-6>
 17. Iwafuchi-Doi M., Donahue G., Kakumanu A., Watts J.A., Mahony S., Pugh B.F., Lee D., Kaestner K.H., Zaret K.S. (2016) The pioneer transcription factor FoxA maintains an accessible nucleosome configuration at enhancers for tissue-specific gene activation. *Mol. Cell.* **62**(1), 79–91.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.001>

The Efficiency of Gene Activation Using CRISPR/dCas9-Based Transactivation Systems Depends on the System Run Time

A. S. Artyuhov¹, D. A. Dorovskiy², A. V. Sorokina¹, K. M. Shakirova¹,
 E. D. Momotyuk^{1,3}, and E. B. Dashinimaev^{1,2,*}

¹Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

²Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

³Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: dashinimaev@gmail.com

One promising application based on the CRISPR/Cas9 system is the transactivator systems, which allow targeted control of the genes expression levels in cell culture. However, their performance has been reported to vary considerably depending on the cell type and the activator system used. In this work, we compared the efficacy of the three activator systems dCas9-VP160, dCas9-SunTag, and dCas9-VPR in an immortalized human skin fibroblast line to activate the expression of *OCT4*, *NANOG*, *PDX1*, *FOXA2*, *NKX2-2*, and *NKX6-1* genes. It was shown that the efficiency of activation of these genes really depended on the type of activator system, and the strength of activation depended on the duration of the activator system.

Keywords: CRISPR/Cas9, activation, dCas9-VP160, dCas9-SunTag, dCas9-VPR

УДК 577.21

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ ДНК И РНК ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОМНЫХ РЕДАКТОРОВ В КЛЕТКИ ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ *in vitro* И *in vivo*

© 2022 г. А. А. Загоскин^а, М. В. Захарова^а, М. О. Нагорных^{а, б, *}^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук, Пущино, 142290 Россия^бНаучно-технологический университет “Сириус”, Сочи, 354349 Россия*e-mail: derbanner@gmail.com

Поступила в редакцию 18.05.2022 г.

После доработки 25.06.2022 г.

Принята к публикации 28.06.2022 г.

Возможность редактирования генетической информации, которая появилась относительно недавно благодаря активному внедрению в исследовательскую и биомедицинскую практику программируемых нуклеаз, открыла широкие перспективы применения, в том числе в таких важных областях, как здравоохранение и агробиотехнологии. Одним из наиболее важных вопросов совершенствования технологий редактирования генетической информации, особенно в контексте терапевтического применения, остается вопрос доставки редакторов в клетки и ткани, а также управляемой и безопасной экспрессии этих трансгенов. В настоящий момент существуют системы вирусной и невирусной доставки. В представленном обзоре мы рассмотрим структурные элементы невирусных экспрессионных векторов на основе ДНК и РНК, используемых в геномном редактировании, а также способы доставки этих векторов *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: экспрессионный вектор, синтетические мРНК, доставка генов, геномное редактирование, Cas9, ZFN, TALEN, геномная терапия, наночастицы

DOI: 10.31857/S002689842206026X

ВВЕДЕНИЕ

На данный момент существуют три основных варианта генетических редакторов – это системы, основанные на использовании ZFN, TALEN и CRISPR/Cas. Применение таких систем сопряжено с созданием векторов для экспрессии этих белков. В настоящее время широкое применение получили вирусные и невирусные экспрессионные векторы. К невирусным относятся векторы на основе ДНК, а также синтетических мРНК. В общих чертах структура векторов на основе ДНК, применяемых в редактировании генома, мало чем отличается от векторов экспрессии других терапевтических рекомбинантных белков. В обоих вариантах присутствуют такие структурные элементы, как промоторы, энхансеры, поли(А)-последовательности, селективные маркеры, сайт инициации репликации и т.д. Отличия в структуре касаются специфических элементов, необходимых для функционирования редакторов генома и в каждой системе редактирования имеют свои особенности. Так, в большинстве случаев с последовательностью геномного редактора сливаются сигнал ядерной локализации, а векторы, несущие системы CRISPR-Cas, содержат промото-

ры для РНК-полимераз типа II и III, поскольку кроме белков необходимо получать гидовую (направляющую) РНК.

Молекулы РНК также можно использовать в качестве экспрессионного вектора для синтеза терапевтических белков, в том числе для генетического редактирования клеточной ДНК, причем такой способ доставки имеет ряд существенных преимуществ перед ДНК-векторами. Так, при использовании РНК вероятность интеграции вектора или его частей в геном крайне мала, что практически исключает события мутагенного характера. Вторым существенным преимуществом является то, что РНК в комплексе с липидными наночастицами представляет собой биodeградируемый носитель. Еще один плюс РНК состоит в том, что такому вектору не нужно сначала попасть в ядро клетки – трансляция трансгена происходит сразу после попадания в цитоплазму. Наконец, транзитный характер экспрессии трансгена с РНК также лучше поддается контролю, что позволяет избежать чрезмерной продукции таких трансгенов, как молекулы генных редакторов, и снижает риск неспецифического редактирования генома клетки. Необходимо отметить и основные

недостатки использования искусственных РНК-носителей. Ограничения прежде всего обусловлены нестабильностью РНК, а также высокой иммуногенностью чужеродной РНК, что связано со сформированными эволюцией механизмами противовирусного иммунитета у эукариот.

Потенциал биомедицинского использования синтетических мРНК был продемонстрирован в 1990 году в эксперименте по экспрессии разных белков в клетках скелетных мышц мышей. Однако проблемы с вне- и внутриклеточной стабильностью, иммуногенностью РНК, а также сложность масштабного производства затормозили распространение использования синтетических мРНК в терапевтических целях. В настоящее время синтез одноцепочечных молекул РНК *in vitro* — это широко распространенная лабораторная процедура, которая активно используется как для изучения РНК, так и для получения терапевтических препаратов на основе РНК. Этот способ применим для биохимического и молекулярного анализа РНК, изучения РНК-белковых взаимодействий, а также для структурного анализа комплексов, создания РНК-аптамеров, синтеза функциональных мРНК для экспрессии и получения малых РНК, влияющих на экспрессию генов (например, направляющих РНК для генных редакторов). Кроме того, синтезированные *in vitro* РНК сыграли важную роль в разработке РНК-вакцин и инструментов редактирования генома CRISPR/Cas9, ZFN, TALEN, а также в создании плюрипотентных стволовых клеток и методов диагностики, основанных на амплификации РНК.

В данном обзоре мы рассмотрим основные структурные элементы экспрессионных векторов на основе ДНК и РНК, в том числе, используемых в редактировании генов, а также способы их доставки *in vitro* и *in vivo*.

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЭКСПРЕССИОННЫХ ВЕКТОРОВ НА ОСНОВЕ ДНК ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОМНЫХ РЕДАКТОРОВ

Промоторы

Промотор — это нуклеотидная последовательность, с которой специфически связывается комплекс РНК-полимеразы, что приводит к инициации транскрипции нуклеотидной последовательности, расположенной ниже промотора. В клетках млекопитающих присутствуют несколько типов РНК-полимераз, каждая из которых взаимодействует со специфическими промоторами. Чаще всего исследователей интересуют промоторы, которые способны взаимодействовать с РНК-полимеразой II, поскольку именно эта полимераза ответственна за синтез мРНК, с которых синтезируются полипептиды [1]. Функционирование любого

промотора осуществляется за счет взаимодействия белков, входящих в состав РНК-полимеразы, с определенными нуклеотидными мотивами в составе промотора. В структуре промоторов млекопитающих, взаимодействующих с РНК-полимеразой II, выделяют около 10 различных мотивов, из которых наиболее известны инициатор и TATA-бокс, но помимо них есть еще MTE, BREu, BREd, XCPE1 и другие [2]. Большинство мотивов имеют фиксированное положение на промоторе относительно точки старта транскрипции, однако, например, CpG-островки могут располагаться в различных позициях. В строении промоторов важно как положение мотивов, так и их состав. На основе этих двух параметров промоторы делят на два типа: рассеянные и сфокусированные. К рассеянному типу чаще всего относятся промоторы, обеспечивающие экспрессию генов домашнего хозяйства. В них часто отсутствуют инициатор и TATA-бокс, но содержится большое количество CpG-островков. Эти промоторы обеспечивают стабильную умеренную экспрессию контролируемого гена. В качестве примера можно рассмотреть промотор гена фосфоглицераткиназы человека (hPGK). Этот промотор содержит большое количество CpG-островков, однако в нем отсутствуют TATA-бокс и последовательность инициатора. В промоторах сфокусированного типа, напротив, чаще всего мало CpG-островков, но присутствуют мотивы, обеспечивающие сильное взаимодействие с комплексами РНК-полимеразы. Это, к примеру, инициатор и TATA-бокс [3]. В клетке такие промоторы обычно обеспечивают экспрессию на высоком уровне в короткие сроки. Промоторы этого типа часто встречаются в геномах вирусов. К промоторам сфокусированного типа относятся промотор вируса SV40 или промотор гена *EFla* человека. Поскольку при создании векторов исследователи хотят добиться высокого уровня экспрессии рекомбинантных белков, они используют промоторы именно сфокусированного типа. На практике оказывается, что многие такие промоторы имеют вирусную природу, к примеру, промотор SV40 или цитомегаловируса (CMV). Иногда возникает потребность в РНК-продукте, структура которого отличается от структуры мРНК. В частности, это необходимо для получения направляющей РНК для системы редактирования генома CRISPR/Cas. С этой целью используют промотор, который взаимодействует с РНК-полимеразой III, например, промотор U6 [4]. Помимо промоторов, обеспечивающих стабильную экспрессию, существуют и индуцируемые промоторы. Промоторы этого типа могут относиться как к рассеянному, так и к сфокусированному, однако в состав такого промотора входит регуляторный элемент, через который и осуществляется контроль экспрессии [5]. В качестве примера можно привести такую индуци-

бельную систему, как Tet-On или термоиндукцибельный промотор Hsp70. Такие промоторы бывают выгодными при цитотоксичности синтезируемого белка, или когда необходимо дать клеточной культуре время для роста, прежде чем экспрессировать целевой ген. Промоторы еще одного типа, имеющие много общего с индукцибельными промоторами, это тканеспецифичные промоторы, которые могут относиться как к рассеянному, так и к сфокусированному типу, но содержат мотив или мотивы, с которыми специфически взаимодействует какой-либо белок. В большинстве случаев таким белком является тканеспецифичный фактор транскрипции. Из-за того, что экспрессия гена под контролем таких промоторов будет происходить строго в определенном типе ткани, их применяют при генетическом редактировании *in vivo* [6]. В качестве примера можно привести промотор SLPI, активный в некоторых видах карцином и на низком уровне обеспечивающий экспрессию гена ингибитора секретируемой лейкопротеазы в печени. Промоторы бывают различной “силы”, т.е. определяют разный уровень экспрессии гена. Они могут обеспечивать как стабильную экспрессию генов, так и экспрессию в определенном типе тканей под действием некоего индуктора, имеют разный размер, который может колебаться от сотен до тысяч нуклеотидов – все эти параметры нужно подбирать, исходя из потребностей эксперимента.

Энхансеры

Энхансеры увеличивают уровень экспрессии гена за счет повышения локальной концентрации транскрипционных факторов. Как и промоторы, энхансеры осуществляют свою функцию, используя множество мотивов, которые привлекают транскрипционные факторы. [7]. В геноме энхансеры чаще всего находятся далеко от контролируемого промотора, вплоть до того, что промотор и энхансер могут располагаться на разных хромосомах [8]. При этом за счет архитектуры ДНК энхансеры находятся около подконтрольного промотора, что является обязательным условием работы энхансера. Однако в векторах энхансеры располагаются перед промотором. Эукариотические энхансеры чаще всего имеют довольно большой размер, поэтому широкое применение нашли вирусные варианты этих элементов, имеющие небольшой размер. Так, широко используется энхансер CMV [9], с которым сливают как вирусные, так и эукариотические промоторы. Большинство векторов, используемых в настоящее время, содержат энхансер, так как это позволяет повысить уровень экспрессии целевого гена.

Нетранслируемые последовательности

Трансляция полипептида начинается с инициаторного кодона (старт-кодона) AUG, но для ее успешной инициации необходимо, чтобы старт-кодон находился в определенном нуклеотидном окружении – в последовательности Козак. Этот мотив довольно консервативен: у высших эукариот он представлен последовательностью GCC(A/G)CCATGG, особенно важными в которой являются нуклеотиды в положении –3 и +4 [10]. Функционирование последовательности Козак осуществляется за счет взаимодействия с 40S субъединицей рибосомы и факторами инициации трансляции. В процессе сканирования мРНК рибосома задерживается на вторичной структуре, образованной последовательностью Козак, что повышает вероятность инициации трансляции [11]. При создании вектора последовательность Козак обязательно встраивают непосредственно перед геном, поскольку без нее эффективность трансляции будет значительно ниже. С 3'-конца мРНК располагается поли(А)-хвост – последовательность, которая значительно повышает стабильность мРНК и эффективность трансляции. Для синтеза поли(А) в составе мРНК в плазмиду должен быть включен сигнал полиаденилирования – консервативная последовательность с мотивом AATAAA, за которым следует GT-богатая область. мРНК без поли(А)-хвоста подвергается быстрой деградации клеточными нуклеазами, что негативно влияет на общую эффективность экспрессии трансгена [12]. Поэтому включение в экспрессионную кассету сигнала полиаденилирования после каждой белоккодирующей последовательности также является обязательным этапом при создании вектора, экспрессирующего рекомбинантный белок.

Селективный маркер

Селективный маркер помогает провести отбор успешно трансформированных клеток. Зачастую в качестве такого элемента используют гены устойчивости к какому-либо антибиотику, это позволяет быстро отобрать трансфицированные клетки по принципу их выживаемости после добавления соответствующего антибиотика в питательную среду. К тому же присутствие гена устойчивости к антибиотику позволяет убедиться, что плазида не будет элиминирована клеткой со временем, поскольку при постоянном давлении антибиотика клетке для выживания необходимо экспрессировать ген устойчивости к антибиотику. В целях экономии места селективный маркер можно экспрессировать в одной рамке считывания вместе с трансгеном, используя 2А пептид или IRES-элемент [13]. Однако стоит учитывать, что уровень экспрессии под контролем IRES-элемента значительно ниже чем под контролем про-

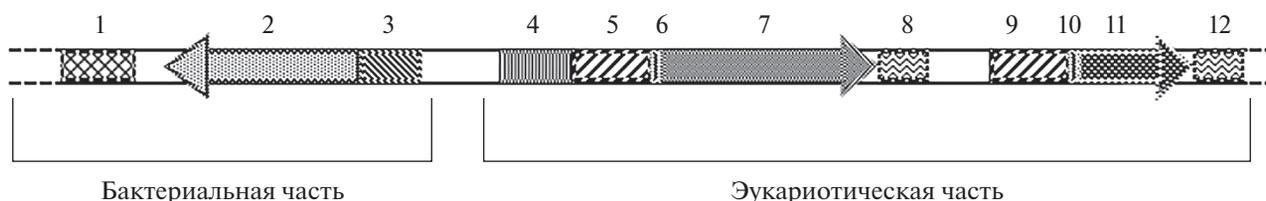


Рис. 1. Структура базового вектора для эукариотической экспрессии терапевтических белков. 1 – ориджин репликации; 2 – прокариотический селективный маркер; 3 – прокариотический промотор; 4 – эукариотический энхансер; 5, 9 – эукариотический промотор, специфически взаимодействующий с РНК-полимеразой II; 6, 10 – последовательность Козак; 7 – ген целевого белка; 8, 12 – сигнал полиаденилирования; 11 – эукариотический селективный маркер.

мотора. Помимо генов устойчивости, в качестве маркера селекции в эукариотических клетках используют также флуоресцентные белки, такие как GFP. В таком случае трансформанты отбирают с помощью клеточных сортеров. Такой подход уместен, когда необходимо временно экспрессировать трансген, после чего желательно, чтобы плазмида была элиминирована из клетки и в дальнейшем не нагружала клеточный трансляционный аппарат [14]. В частности, такой подход используется при создании плазмид, несущих генные редакторы. Свечение флуоресцентных белков позволяет отобрать трансформанты, а генетические редакторы работают в течение короткого срока, после чего плазмида утилизируется путем деградации. Также в плаزمиде присутствует “бактериальная” часть, которая необходима для получения большого количества плазмиды перед трансфекцией эукариотических клеток. В бактериальной части в обязательном порядке присутствует прокариотический селективный маркер, чаще всего это ген устойчивости к ампициллину. Этот ген позволяет культивировать клетки *Escherichia coli* на среде, содержащей ампициллин, и, что важнее, удерживать плазмиду в клетке.

Сигнальный пептид

Зачастую бывает недостаточно просто экспрессировать целевой ген, необходимо обеспечить секрецию белка из клетки или его поступление в компартмент, в котором он должен функционировать. С этой целью используют сигнальные пептиды, кодируемые 5'-концевым участком нуклеотидной последовательности трансгена. В итоге синтезированный белок доставляется в клеточный компартмент, определяемый сигнальным пептидом. Генетические редакторы обычно сливаются с сигналами ядерной локализации, вследствие чего синтезированный редактор доставляется в клеточное ядро, где и проявляет свою активность [15].

Точка начала репликации

Еще один важный компонент бактериальной части вектора – точка начала (ориджин) реплика-

ции. Это область, с которой начинается синтез копий плазмиды в бактериальной клетке. По сути это регуляторный участок, от которого зависит количество копий плазмиды в клетке: бывают низкокопийные и высококопийные ориджины репликации. Поскольку исследователям чаще всего необходимо получить большое количество копий плазмиды, широкое распространение получил высококопийный ориджин репликации ColE1 [16].

Использование экспрессионных векторов на основе ДНК для доставки геномных редакторов

Суммируя все сказанное, карту базового вектора для экспрессии рекомбинантных терапевтических белков можно схематично представить следующим образом. Базовый вектор должен иметь бактериальную часть, которая будет состоять из ориджина репликации для получения большого количества копий плазмиды в *E. coli* и прокариотического селективного маркера устойчивости вектора в клетках *E. coli*. В “эукариотической” части вектора должны находиться слитые энхансер и промотор, под контролем которого будет экспрессироваться некий целевой белок. С 5'-конца последовательности, кодирующей белок, должна располагаться последовательность Козак, а с 3'-стороны – сигнал полиаденилирования с терминатором. Если вектор предполагается использовать *in vitro*, то необходим эукариотический селективный маркер, контролируемый вторым промотором, такой как ген устойчивости к антибиотику, поскольку этот маркер тоже является белком, необходимы также последовательности Козак и поли(A) (рис. 1).

В качестве примера строения вектора, несущего генетический редактор на основе ZFN, можно рассмотреть векторы, представленные в работе Zou J. и соавт. [17]. Предложенный ими вектор содержит целевой ген – последовательность, кодирующую химерный белок, состоящий из домена нуклеазы FokI и собственно цинковых пальцев, которые направят нуклеазу к нужному участку генома. Кроме того, с 5'-стороны последовательности, кодирующей белок, находится сигнал ядерной локализации. В качестве маркера селекции вектор со-

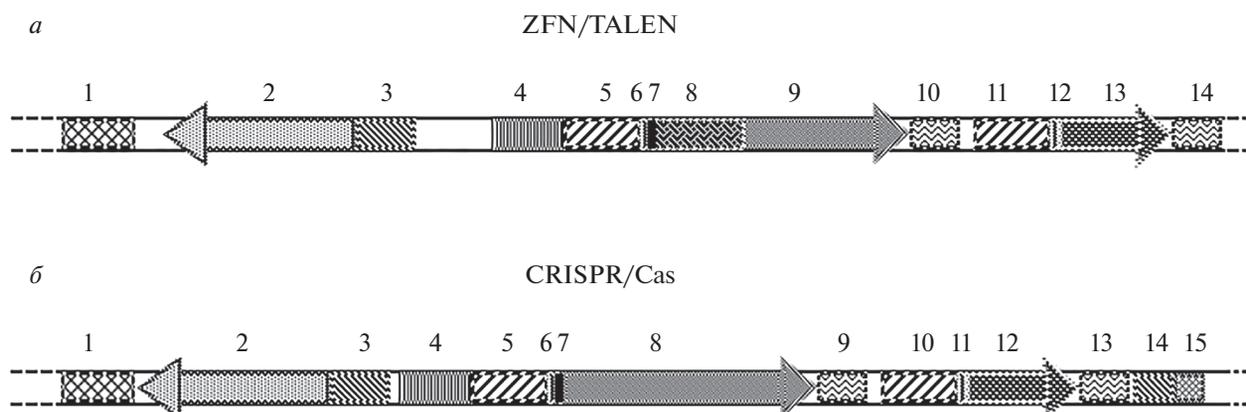


Рис. 2. Строение векторов для экспрессии генетических редакторов в эукариотических клетках. *а* – Векторы экспрессии для редактирования генома с использованием ZFN и TALEN очень похожи, отличается лишь элемент 8. Так, в первом случае нацеливание осуществляется цинковыми пальцами, а во втором – эффекторным ДНК-связывающим доменом. 1 – ориджин репликации; 2 – прокариотический селективный маркер; 3 – прокариотический промотор; 4 – эукариотический энхансер; 5, 11 – эукариотический промотор, специфически взаимодействующий с РНК-полимеразой II; 6, 12 – последовательность Козак; 7 – сигнальный пептид ядерной локализации; 8 – цинковые пальцы/эффекторный ДНК-связывающий домен; 9 – эндонуклеаза FokI; 10, 14 – сигнал полиаденилирования; 13 – эукариотический селективный маркер; *б* – 1 – ориджин репликации; 2 – прокариотический селективный маркер; 3 – прокариотический промотор; 4 – эукариотический энхансер; 5, 10 – эукариотический промотор, специфически взаимодействующий с РНК-полимеразой II; 6, 11 – последовательность Козак; 7 – сигнальный пептид ядерной локализации; 8 – белок Cas, обладающий эндонуклеазной активностью; 9, 13 – сигнал полиаденилирования; 12 – эукариотический селективный маркер; 14 – промотор U6, специфически взаимодействующий с РНК-полимеразой III; 15 – последовательность направляющей РНК.

держит ген устойчивости к бластицидину, обеспечивающий быстрый отбор трансфицированных клеток. В остальном это типичный вектор для синтеза рекомбинантных белков (рис. 2*а*). Редакторы могут быть направлены не только в клеточное ядро, но и в митохондрии [18]. Поскольку компартмент, в котором должно происходить редактирование, отличен от ядра, то с N-конца белка поместили сигнал транспорта в митохондрии. Синтезируемый белок поступал в митохондрии, где проявлялась активность эндонуклеазы FokI.

Нацеливание на участок-мишень в технологии, основанной на использовании TALEN, обеспечивали эффекторные ДНК-связывающие домены, а расщепление осуществлял домен нуклеазы FokI. Эффекторные ДНК-связывающие домены – это небольшие, довольно консервативные участки, состоящие из 33–34 аминокислотных остатков с вариabельными остатками в позициях 12 и 13. Взаимодействие с ДНК происходит за счет вариabельных аминокислот. Если несколько таких узнающих доменов расположить последовательно, то можно узнавать различные мотивы в ДНК. Таким образом, в данном случае синтезируется химерный белок, который состоит из домена TALEN и нуклеазы FokI, соединенных спейсером. Следовательно, вектор для экспрессии генетического редактора на основе TALEN также не будет отличаться от базового вектора, определяющего синтез рекомбинантных белков, поскольку весь редактор представляет собой один

большой белок [19] (рис. 2*а*). В качестве примера можно рассмотреть работу Kim Y.H. и соавт., которые попытались с помощью генетического редактора на базе TALEN изменить набор антигенов на поверхности эритроидных клеток-предшественников, чтобы получить кровь универсальной I группы из крови любой другой группы [20]. К нуклеотидной последовательности, кодирующей TALEN, присоединили сигнал ядерной локализации, в остальном этот вектор можно назвать стандартным, за исключением одной особенности – в нем отсутствует эукариотический селективный маркер, но это обусловлено спецификой и требованиями эксперимента. К недостаткам систем, основанных на ZFN и TALEN, относится сложность создания узнающих доменов, а иногда и невозможность подобрать модули для узнавания нуклеотидной последовательности. Преимуществом же является относительно небольшой размер вектора экспрессии.

В отличие от ZFN и TALEN генетический редактор на базе CRISPR/Cas представляет собой комплекс, состоящий из эндонуклеазы Cas и направляющей РНК. В этом и будет заключаться основное отличие вектора экспрессии редактора CRISPR/Cas [21]. Синтезируемая направляющая РНК по структуре существенно отличается от РНК, синтезируемых РНК-полимеразой II. В направляющей РНК отсутствуют кеп и поли(А)-хвост, характерные компоненты мРНК. Для синтеза такой РНК необходимо использовать РНК-

полимеразу III, следовательно, в состав вектора должен входить промотор, который способен взаимодействовать с такой полимеразой. Наиболее часто используется промотор U6 человека [22]. В остальном же состав вектора будет таким же, как у типового вектора, используемого для синтеза рекомбинантных белков (рис. 2б). В качестве примера можно рассмотреть вектор из исследования, выполненного Gabriel C.H и соавт. [23]. В этой работе редактор на базе CRISPR/Cas использовали для получения нокаутов генов. В качестве селективного маркера использовали GFP, который экспрессировали с той же рамки считывания, что и белок Cas9. Для получения двух белков между Cas9 и GFP поставили 2A пептид. Еще одно отличие состоит в том, что промотор, под контролем которого экспрессировали Cas9, не был слит с энхансером, вместо этого после промотора находился интрон. Этот элемент также может усилить экспрессию целевого продукта.

Таким образом, можно сказать, что помимо стандартных элементов в состав экспрессионного вектора могут входить различные функциональные элементы. Если необходимо поместить плазмидную ДНК в вирусные частицы, то вектор должен содержать участки, с которыми специфически взаимодействует вирусный капсид. Экспрессия трансгена может модулироваться также путем включения каких-либо регуляторных элементов. В конечном итоге выбор элементов зависит либо от требований эксперимента, либо от области терапевтического применения генного редактирования.

СТРУКТУРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ СИНТЕТИЧЕСКИХ мРНК ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНОМНЫХ РЕДАКТОРОВ

Структура природных мРНК

мРНК, синтезируемая в ядре, подвергается различным модификациям, после чего она транслируется в цитоплазме. После модификации 5'- и 3'-концов мРНК становится функционально активной. Транскрибируемая мРНК подвергается сплайсингу, а также двум значительным модификациям. К первому трифосфату с 5'-конца премРНК через особую 5'-5'-связь добавляется 7-метилгуанозин и образуется структура, известная как кеп. Эта структура защищает зрелую мРНК от деградации, а также способствует ядерному транспорту и эффективной трансляции. Вторая модификация – посттранскрипционное добавление на 3'-конец молекулы РНК поли(А)-хвоста примерно из 100–250 остатков аденозина. Добавление поли(А)-хвоста придает стабильность молекуле мРНК, способствует экспорту мРНК в цитозоль и вместе со структурой 5'-кепа участвует в образовании трансляционно-компетентного рибонуклеопротеинового комплекса. Зрелая мРНК

образует кольцевую структуру (замкнутую петлю), соединяя кеп с поли(А)-хвостом через кеп-связывающий белок eIF4E (эукариотический фактор инициации трансляции 4E) и поли(А)-связывающий белок (PABP), которые взаимодействуют с eIF4G (эукариотический фактор инициации трансляции 4G). Таким образом, основные требования к функциональной мРНК – это наличие кеп-а (7-метилгуанозина) на 5'-конце и поли(А)-хвоста на 3'-конце [24].

Транскрипция и кепирование синтетических мРНК

Транскрипция – один из основных биологических процессов, формирующих центральную догму молекулярной биологии. ДНК-зависимые РНК-полимеразы, которые осуществляют эту стадию передачи генетической информации, распространены во всех формах жизни. Как правило, эти ферменты представляют собой сложные мультисубъединичные комплексы, которые осуществляют транскрипцию генов прокариот и эукариот *in vivo*. *In vitro* мРНК синтезируют с использованием полимераз бактериофагов (Т7, Т3 и SP6) – односубъединичных ферментов, для активности которых требуются только ионы Mg^{2+} . Матрицей для транскрипции *in vitro* выступает молекула ДНК (ПЦР-фрагмент или линейаризованная плазида), которая содержит последовательность соответствующего промотора. Далее фермент синтезирует комплементарную молекулу РНК, по окончании процесса транскрипционный комплекс диссоциирует, так что ДНК-матрица и фермент могут повторно использоваться в реакции. Благодаря этому процессу выход синтетической мРНК может достигать миллиграммовых количеств. После транскрипции РНК обрабатывают ДНКазой I для удаления ДНК-матрицы и очищают перед кепированием. Этот метод позволяет с высоким выходом получить РНК с 5'-трифосфатными концами, которые далее необходимо преобразовать в кеп-структуры [25].

Для эффективной трансляции синтетической мРНК необходимы кеп и поли(А)-хвост, характерные для зрелой мРНК, которые могут быть добавлены во время или после синтеза РНК в отдельных реакциях, катализируемых кепирующими ферментами и поли(А)-полимеразой соответственно (рис. 3). Дополнительно в искусственные молекулы РНК могут быть включены модифицированные внутренние основания, а также модифицированные кеп-структуры – все это повышает стабильность и трансляционную активность итоговой молекулы. В зависимости от выбранной стратегии кепирования используют два варианта реакции транскрипции *in vitro*: стандартный синтез с ферментативным кепированием после реакции транскрипции (посттранскрипционное кепирование) или включение аналога кеп-а в ходе транскрипции

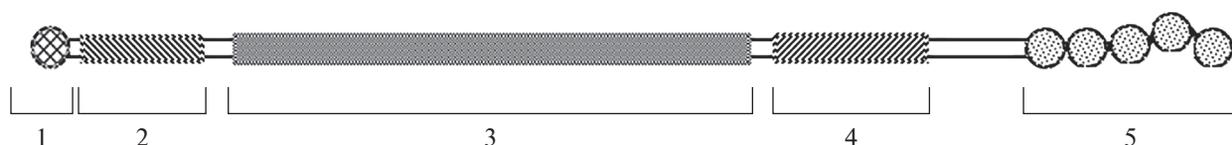


Рис. 3. Структура синтетической мРНК. 1 — кеп-структура; 2 — 5'-нетранслируемая область; 3 — открытая рамка считывания, кодирующая трансген; 4 — 3'-нетранслируемая область; 5 — поли(А)-хвост.

(котранскрипционное кепирование). Стратегии синтеза мРНК *in vitro* зависят от желаемого масштаба синтеза.

Посттранскрипционное кепирование мРНК часто выполняется с использованием ферментов вируса осповакцины. Этот ферментный комплекс превращает 5'-трифосфатные концы транскриптов *in vitro* в структуры m7G-кеп. Система кепирования вируса осповакцины включает три активности (РНК-трифосфатаза, гуанилилтрансфераза, гуанин-N7-метилтрансфераза), которые необходимы для образования полной структуры кеп 0 (m7Gppp5'N) с помощью GTP и донора метильной группы S-аденозилметионина. Дополнительно в ту же ферментативную реакцию можно включить 2'-О-метилтрансферазу, которая приводит к образованию структуры кеп 1, благодаря метилированию 2'-О-позиции следующего за кепом нуклеотида, что является природной модификацией многих эукариотических мРНК [26].

При котранскрипционном кепировании аналог кеп-структуры встраивается в РНК как первый нуклеотид синтезируемой молекулы. Аналог кеп-структуры вводится в реакцию транскрипции вместе с четырьмя стандартными нуклеозидтрифосфатами в оптимизированном соотношении аналога кеп-структуры и GTP, равном 4 : 1. Это позволяет инициировать образование значительного числа кеп-содержащих транскриптов среди синтезируемых молекул РНК. В результате образуется смесь транскриптов, из которых ~ 80% кепированы, а остальные имеют 5'-трифосфатные концы. Снижение общего выхода продуктов РНК обусловлено более низкой концентрацией GTP в реакции. При котранскрипционном кепировании используются синтетические аналоги кеп-структуры. Существует несколько аналогов, используемых для котранскрипционного кепирования РНК. Наиболее распространены стандартный аналог кеп-структуры — 7-метилгуанозин (m7G) и симметричный аналог кеп-структуры (ARCA), также известный как 3'-О-me-7-meGpppG. Стандартный аналог кеп-структуры m7G можно встроить в молекулу РНК как в прямой, так и в обратной ориентации, что значительно снижает общий уровень трансляции такого препарата мРНК. ARCA метилирован по 3'-положению m7G, что позволяет встраивать этот аналог кеп-структуры только в прямой ориентации и получать пул кепированных мРНК, трансляционная активность которых составляет

100%. Выход продуктов такой реакции ниже, чем в реакции транскрипции без синтетических аналогов кеп-структуры. Кеп-структуру ARCA можно конвертировать в структуру кеп 1, используя кеп-зависимую 2'-О-метилтрансферазу и S-аденозилметионин в последующей ферментативной реакции [27]. Также необходимо отметить, что получен ряд других синтетических аналогов кеп-структуры с улучшенными свойствами, в том числе, аналог кеп-структуры 1 компании “Trilink Biotechnol.” (США).

Модифицированные нуклеотиды и оптимизация нуклеотидного состава синтетических мРНК

Природные РНК, как правило, подвергаются созреванию не только с 5'- и 3'-концов, но и при помощи модификации отдельных нуклеотидов внутри молекулы. Использование модифицированных аналогов нуклеотидов в составе синтетических мРНК рассматривается как наиболее эффективный способ избегания активации клеточных сенсоров (TLR3, TLR7, TLR8, PKR), которые запускают иммунный ответ на чужеродную РНК (как правило, вирусную). Это означает, что синтез РНК *in vitro* можно проводить со смесью модифицированных нуклеотидов вместо обычной смеси трифосфатов А, G, C и U. Чаще всего используют такие модифицированные нуклеотиды, как встречающийся в природе 5'-метилцитидин и/или псевдоуридин (а также N1-метилпсевдоуридин), вместо C и U соответственно [28]. Показано, что это решение значительно влияет на стабильность мРНК в клетке, а также на эффективность трансляции и снижение клеточного иммунного ответа на такую РНК, что особенно важно в ряде терапевтических приложений мРНК, например, в задачах генного редактирования, заместительной белковой терапии или дифференцировки стволовых клеток при помощи кодируемых мРНК транскрипционных факторов. Так, экспрессия генного редактора ZFN с синтетических мРНК, содержащих модифицированные нуклеотиды, в тканях легких мыши была значительно выше, чем с немодифицированной мРНК [29]. Важно отметить, что выбор нуклеотидов может влиять на общий выход реакций синтеза мРНК *in vitro*. Практически можно получать мРНК с нужной модификацией. Транскрипты с полной заменой одного или нескольких нуклеотидов могут быть кепированы

посттранскрипционно или котранскрипционно путем включения ARCA или другого аналога кепка. Необходимо отметить также важность хроматографической очистки итоговых мРНК при помощи для минимизации неспецифического иммунного ответа [30]. Еще один фактор, влияющий на эффективность трансляции синтетической РНК — оптимизация состава кодонов транскрипта с учетом как организма, так и типа тканей и клеток. В ходе такой оптимизации отдельные редкие кодоны замещаются синонимичными, которые транслируются эффективнее. Чаще всего это приводит к усилению трансляции и стабильности РНК, но такой подход не всегда подходит для терапевтических белков. В некоторых случаях для корректного фолдинга белков, кодируемых синтетическими мРНК, необходимо снижение скорости трансляции на определенных участках последовательности, поэтому значение оптимизации кодонов в таких ситуациях неоднозначно [31].

5'- и 3'-нетранслируемые области синтетических мРНК

Стабильность и трансляционную активность мРНК в клетке во многом определяют 5'- и 3'-нетранслируемые области (UTR). Эти регуляторные области фланкируют кодирующую последовательность мРНК транскрипта. Они содержат различные мотивы и вторичные структуры, которые определяют стабильность мРНК, а также распознавание мРНК рибосомами и взаимодействие с компонентами трансляционного аппарата [32]. Включение таких последовательностей в состав синтетической мРНК может улучшить трансляцию и стабильность мРНК. Многие UTR, которые усиливают трансляцию мРНК, являются природными. Так, например, UTR мРНК альфа- и бета-глобинов широко используются для создания синтетических мРНК. Более того, стабилизирующий эффект можно усилить, расположив последовательно две копии 3'-UTR мРНК бета-глобина. Аналогичные эффекты на синтетические мРНК оказывают UTR мРНК белка теплового шока 70 человека, альбумина, а также белков альфа-вирусов [33].

В качестве альтернативы природным UTR можно использовать синтетические UTR, разработанные в лаборатории. Так, *de novo* сконструирована последовательность 5'-UTR длиной всего лишь 14 нуклеотидов, которая обеспечивает уровень экспрессии, сопоставимый с уровнем 5'-UTR альфа-глобина человека [34]. Современные скрининговые технологии позволяют экспериментально отбирать UTR с улучшенными свойствами [35].

Поли(А)-хвост синтетических мРНК

Полиаденилированный 3'-концевой участок мРНК, так называемый поли(А)-хвост, — это важный структурный элемент, определяющий продолжительность жизни молекул мРНК. Несмотря на ряд исключений, поли(А)-хвосты большинства природных молекул мРНК в клетках млекопитающих имеют длину до 250 нуклеотидов, и они постепенно укорачиваются в течение всего времени жизни мРНК в клетке. Кроме того, поли(А)-хвост играет важную роль в трансляции, а именно, в образовании трансляционно-активного комплекса мРНК с факторами трансляции [36]. Поскольку размер “хвоста” влияет на стабильность мРНК, предотвращая ее 3'-экзонуклеазную деградацию, то в синтетические мРНК желательно включать поли(А)-хвосты длиной примерно 100–120 нуклеотидов. Экспериментально показано, что если длина поли(А)-хвоста превышает 120 нуклеотидов, то это приводит к существенному увеличению событий рекомбинации с участием этой последовательности в клетках бактерий. В итоге это влияет на стабильность плазмиды, которая используется как матрица для синтеза мРНК *in vitro*, и снижает выход при наработке плазмиды в бактериальной культуре. Полиаденилирование мРНК *in vitro* можно осуществлять либо путем ферментативного добавления поли(А)-хвоста к кефированной мРНК с использованием рекомбинантной поли(А)-полимеразы, либо путем кодирования этой последовательности в плазмидном векторе [25]. Полиаденилирование при помощи отдельного фермента добавляет лишнюю стадию в процесс синтеза мРНК, а также не дает возможности точно контролировать количество включенных нуклеотидов во всех молекулах в ходе реакции. Поэтому второй подход, при котором поли(А)-хвост кодируется плазмидой, больше подходит для промышленного производства терапевтических мРНК.

Использование синтетических мРНК для доставки геномных редакторов

Безопасная невирусная доставка геномных редакторов открывает новые перспективы для терапевтического применения генного редактирования терапевтических мРНК хорошо зарекомендовала себя во время пандемии COVID-19. Комбинация мРНК и липидных наночастиц обеспечивает безопасную экспрессию антигенных или терапевтических белков *in vivo*, что подтверждается результатами клинических и доклинических испытаний. За последние годы проведены успешные эксперименты по геномному редактированию с использованием синтетических мРНК. Так, проведено редактирование гена транскретина (*Ttr*) в печени мышей, которое привело к снижению уровня сывороточного белка ТТР более чем на 97% [37]. В этой работе использовали оригинальную систе-

му доставки, основанную на липидных наночастицах, что позволило провести одновременную упаковку мРНК, кодирующих Cas9, вместе с направляющими РНК [37]. Внутривенная совместная доставка мРНК Cas9 и направляющей РНК приводила к редактированию ДНК в тканях печени, почек и легких у мышей [38]. Использование наночастиц другого состава обеспечило эффективное высвобождение РНК внутри клеток благодаря восстановительной среде. Показан эффективный нокаут репортерного гена в клетках эмбриональной почки, накопление внутривенно вводимых наночастиц с мРНК в тканях печени, а также успешный нокаут гена-мишени (до 20% от уровня в сыворотке) [39]. Недавно возможности генного редактирования с применением РНК-платформы доставки были показаны на примере коррекции мышечной дистрофии в клетках мышц, полученных от широкого круга доноров. Подтверждена безопасность доставки генных редакторов при помощи платформы синтетических РНК с точки зрения встраивания трансгена в геном, а также показана высокая эффективность редактирования с возможностью дозирования активности SpCas9 [40]. Показан терапевтический потенциал доставки генных редакторов с помощью липидных наночастиц с синтетическими РНК: нокаунт гена *Angptl3* в печени мыши, проведенный с целью снижения уровня белка ANGPTL3, привел к снижению уровня липидов в крови и коррекции гиперхолестеринемии. Отмечена существенная длительность терапевтического эффекта (до 100 дней после единичной инъекции) и отсутствие неспецифичного редактирования в нескольких наиболее возможных местах, а также гепатотоксичности [41].

СПОСОБЫ ДОСТАВКИ ВЕКТОРОВ ЭКСПРЕССИИ НА ОСНОВЕ ДНК И РНК *in vitro* И *in vivo*

Для успешного применения средств геномного редактирования необходимы не только правильно сконструированные векторы экспрессии, но и эффективные безопасные способы доставки носителей генетической информации внутрь клеток *in vitro*, либо к тканям определенного типа *in vivo*. Эти способы разделяются на три главных вида (табл.1). Первый вид — биологическая доставка, к которой относится трансфекция в составе вирусных векторов либо вирусоподобных частиц. Второй способ — использование физических методов трансфекции. Наконец, третий вид — это химические методы трансфекции. В данном обзоре мы не касаемся вирусных векторов доставки трансгенов, поэтому остановимся только на физических и химических способах трансфекции экспрессионных векторов на основе нуклеиновых кислот.

Физические методы трансфекции

Электропорация. Электропорация, или же электротрансфекция — наиболее распространенный физический метод трансфекции. Традиционно электротрансфекцию проводят *in vitro* в кювете на клетках в суспензии, однако этот метод применим и *in vivo*. Клеточная взвесь с интересующей плазмидной ДНК или мРНК помещается между двумя электродами. Через среду с клетками подается серия коротких электрических импульсов, что приводит к резкому изменению напряжения на клеточной мембране, достигающему критического порога (между 250 и 500 мВ), и возникновению пор в клеточной мембране, через которые нуклеиновая кислота проникает в цитозоль. Под действием электрического поля ДНК и РНК движутся от анода к катоду [42]. Что интересно, более крупные поры в клеточной мембране образуются со стороны, обращенной к аноду, что также способствует проникновению довольно крупных молекул нуклеиновых кислот в клетку. После того как электрические импульсы прекращаются, поры постепенно релаксируют и закрываются. Электротрансфекция — весьма эффективный метод доставки ДНК и РНК, однако при проведении этой процедуры гибнет большое число клеток. Также следует отметить различия в эффективности трансфекции разных клеточных линий, классическим вариантом трансфекции можно модифицировать именно взвесь клеток, т.е. адгезированные клетки модифицировать не удастся. Однако недавно Maschietto и соавт. предложили способ электротрансфекции, обходящий это ограничение [43]. Предложено использовать для культивирования клеток планшеты, дно которых покрыто микроэлектродами. Планшеты представляют собой чипы для электропорации, в которые интегрированы массивы из тонкопленочных емкостных микроэлектродов. Каждый отдельный микроэлектрод представляет собой восьмиугольную структуру, образующую высокопроводящим кремнием *p*-типа, покрытую слоем оксида кремния толщиной 15 нм. Клетки растут на поверхности этих электродов, что позволяет использовать значительно более низкие токи, не теряя при этом в эффективности трансфекции. Утверждается, что эффективность трансфекции клеток СНО-К1 в этом случае достигает 60–80%, при этом высокий уровень смертности клеточной культуры после процедуры не наблюдался. Удалось также трансфицировать уже дифференцированные нейроны после 6 дней культивирования, хотя и с низкой эффективностью, составившей ~10%. Для применения этого подхода *in vivo* пришлось разработать ряд электродов, пригодных для использования в условиях в различных органах и тканях [44]. В целом этот метод хорошо принят для использования в клинических условиях из-за его простоты и относительно небольшого коли-

чества побочных эффектов. С использованием электропорации Kawasaki и соавт. смогли доставить генетический редактор CRISPR/Cas внутритробно [45]. Таким образом, на данный момент трансфекция посредством электропорации является весьма эффективным и дешевым способом доставки нуклеиновых кислот в клетки как *in vitro*, так и *in vivo*, ограниченным лишь доступностью соответствующей аппаратуры.

Генная пушка: принцип работы и применение. Как и электропорация, этот подход применим для доставки как плазмидных ДНК, так и мРНК. Изначально этот метод применяли для модификации растительных клеток, но его потенциал гораздо шире. С использованием генной пушки можно модифицировать различные типы клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Метод основан на бомбардировке клеток разогнанными до высоких скоростей комплексами из частиц тяжелых металлов размером около 1 мкм, покрытых нуклеиновыми кислотами. Сначала использовали частицы вольфрама, но этот металл токсичен для клеток, поэтому его часто заменяют на биологически инертные частицы золота [46]. Ускорение частицам можно придавать разными способами, на данный момент наиболее распространен разгон за счет короткого импульса инертного газа, к примеру гелия. Разогнанные частицы пробивают мембрану клетки и доставляют генетический материал в различные ее части. Нуклеиновые кислоты могут попасть как в цитозоль, так и в ядро или другие органеллы. С помощью этого подхода можно модифицировать пластиды и митохондрии. Главными ограничениями при применении биолистки для трансфекции *in vivo* являются размер самого оборудования и глубина проникновения частиц в организм. Этот подход может использоваться преимущественно для трансфекции эпителиальных и подкожных мышечных тканей в виду их доступности [47]. К главным преимуществам этого метода относятся его высокая эффективность, возможность доставки нескольких плазмид или мРНК одновременно, широкий спектр объектов модификации, возможность модификации уже дифференцированных и растущих в адгезионной культуре клеток. Но есть и ряд недостатков. Первый – высокая стоимость самой генной пушки, при относительно дешевой дальнейшей эксплуатации. Второй существенный недостаток – это высокая клеточная смертность во время процедуры переноса, однако, как сообщают O'Brien и Lummis, использование более низкого давления импульса (порядка 345 кПа) значительно снижает степень повреждения клеток [48]. Метод доставки с использованием генной пушки продолжает развиваться. К важным преимуществам этого метода относится универсальность, применимость к клеткам разного типа, при этом его использование сдерживается высокой стоимостью

оборудования. Вероятно, снижение стоимости привлечет к этому методу больше внимания.

Сонопорация для доставки ДНК и РНК *in vitro* и *in vivo*. В методе сонопорации перенос нуклеиновых кислот осуществляется за счет воздействия на клетки ультразвуковыми волнами. В результате воздействия ультразвука возникают такие эффекты, как кавитация, радиационное давление и микропотоки. Кавитация, т.е. возникновение и схлопывание микропузырьков воздуха, имеет очень высокое локальное давление и повышение температуры, что приводит к нарушению целостности клеточной мембраны, если пузырек схлопывается у поверхности клетки. В эти образовавшиеся поры и проникает нуклеиновая кислота под воздействием остальных эффектов, возникающих в процессе обработки низкочастотным ультразвуком [49]. Описан также способ доставки плазмидной ДНК с использованием комбинации сонопорации и микрофлюидных технологий, в дальнейшем названной методом акустофлюидной сонопорации. Как заявляют разработчики Belling и соавт., этот метод позволяет проводить трансфекцию с высокой скоростью и на большом количестве клеток. В методе акустофлюидной сонопорации смесь клеток и плазмидной ДНК пропускают через капилляр, в котором и происходит обработка ультразвуком. Исследователи, работавшие с клеточной линией Jurkat, сообщают, что им удалось добиться скорости трансфекции около 200000 клеток/мин и при этом жизнеспособность клеток после процедуры составляла около 80% [50]. Этот метод является эффективным и доступным аналогом физических методов трансфекции, хотя отмечается, что необходимо изучать последствия воздействия ультразвука на клетки, особенно на клеточное ядро, которое также подвержено локальным повреждениям в результате кавитации. Сонопорация применяется также для трансфекции *in vivo*, однако ее эффективность с этом случае значительно ниже, чем *in vitro*. Тем не менее, использование этого подхода позволило успешно доставить генетический редактор на базе CRISPR/Cas для лечения облысения по мужскому типу. Исследователи направили генетический редактор на ген *SRD5A2*, для доставки использовали комбинацию нанолипосомных частиц в качестве переносчика и сонопорации в качестве “активатора” частиц. Под действием кавитации частички лопались и доставляли плазмидные векторы непосредственно в клетки волосных луковиц [51].

Фототрансфекция. Трансфекция с помощью лазера осуществляется за счет локального разрушения клеточной мембраны. Пучок лазера фокусируется под микроскопом на клеточной мембране в области 1–2 мкм, после чего подается серия коротких высокоинтенсивных импульсов, что приводит к локальному разрушению мембраны.

При этом плазмидная ДНК из питательной среды проникает в клетку [52]. Продолжительность излучения исчисляется в фемтосекундах, используемая длина волны может значительно различаться и зависит, как правило, от имеющейся аппаратуры, а мощность рекомендуют использовать в диапазоне 50–100 мВт [53]. Однако метод имеет невысокую эффективность трансформации, порядка 25%, а также значительно более низкую пропускную способность в сравнении с ранее рассмотренными методами и подходит, скорее, для точечной трансфекции. Из преимуществ можно отметить применимость метода к клеткам, растущим и в суспензии, и в адгезионной культуре. Также отмечают низкую цитотоксичность данного подхода, что может быть важным при трансфекции одиночных клеток [54].

Химические методы трансфекции

Трансфекция с использованием фосфата кальция.

Трансфекция с использованием фосфата кальция это один из первых методов трансфекции клеток *in vitro* [55]. В основе метода лежит поглощение клетками комплексов, состоящих из плазмидной ДНК и фосфата кальция. Эти комплексы получают, смешивая CaCl_2 с ДНК, после чего добавляют буфер, содержащий соединения фосфора, например НЕРЕС [56]. Образуются выпадающие в осадок комплексы, состоящие из фосфата кальция и плазмидной ДНК. Далее эти комплексы добавляют к клеткам, которые адсорбируют их из питательной среды. Главные преимущества этого метода – его простота и дешевизна. К минусам относится относительно низкая эффективность трансфекции, особенно дифференцированных клеток, и относительно высокий уровень цитотоксичности, а также применимость исключительно *in vitro* [57]. Метод был предложен в 70-х годах прошлого века, но до сих пор широко применяется и даже предпринимаются попытки оптимизации этого метода для повышения его эффективности [58].

Трансфекция с использованием поли-*L*-лизина.

Этот метод также основан на создании комплексов нуклеиновых кислот и носителя, которые поглощаются клеткой. В качестве носителя выступает полимер, состоящий из остатков аминокислоты лизина. Молекула, состоящая из ~10 остатков этой аминокислоты, имеет положительный заряд, за счет которого и образует комплексы с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот. Комплекс из поли-*L*-лизина и нуклеиновой кислоты также имеет суммарный положительный заряд, посредством которого взаимодействует с клеточной мембраной. В таком “классическом” варианте этот способ доставки ДНК имеет ряд недостатков. Во-первых, такие микро-частицы поглощаются лизосомами, где подверга-

ются деградации, что негативно сказывается на общей эффективности трансфекции. Во-вторых, сам комплекс поли-*L*-лизина имеет выраженную цитотоксичность [59]. Однако эти недостатки можно компенсировать, используя дополнительные агенты. Так, добавление такого эндосомоли-тического агента, как глицерин, в клеточную среду до проведения трансфекции решает проблему высвобождения комплексов поли-*L*-лизина из эндосом. А модификация поли-*L*-лизина с помощью PLGA (полилактидогликолид) снижает цитотоксичность и увеличивает общую эффективность трансфекции. При необходимости можно нацеливать комплексы поли-*L*-лизина на определенные типы клеток, присоединяя к полимеру сигнальные последовательности для связывания с поверхностными клеточными рецепторами. Таким же образом в некоторых работах решают проблему поглощения комплекса поли-*L*-лизина эндосомами [60]. Одно из главных преимуществ этого метода состоит в том, что его легко модифицировать под нужды экспериментатора и применять как *in vivo*, так *in vitro*. Однако этот метод обеспечивает не самый высокий уровень трансфекции. Кроме того, образующиеся комплексы имеют разный размер, что также может сказываться на эффективности трансфекции.

Трансфекция с использованием полиэтиленими-на. Полиэтиленимин (ПЭИ) – это полимер, имеющий высокий катионный потенциал за счет большого количества аминогрупп. Можно синтезировать молекулы ПЭИ, имеющие как линейную, так и разветвленную структуру [61], заданного размера и с различными модификациями. При добавлении отрицательно заряженной нуклеиновой кислоты ПЭИ образует с ней комплексы, которыми впоследствии и проводят трансфекцию. Взаимодействие с отрицательно заряженной клеточной мембраной обусловлено суммарным положительным зарядом комплекса. В отличие от комплексов поли-*L*-лизина, комплексы ПЭИ достаточно легко покидают эндосомы за счет эффекта буферизации или “протонной губки” [62]. Все это приводит к высокой эффективности трансфекции, что является главным достоинством данного метода. Главный недостаток ПЭИ – его цитотоксичность, которая прямо пропорциональна размеру частиц комплексов и эффективности трансфекции. Для снижения цитотоксичности в состав комплексов вводят нейтральные гидрофильные сополимеры, такие как полиэтиленгликоль [63]. Трансфекция с применением ПЭИ нашла широкое применение в приложении *in vitro* как эффективный подход к доставке трансгена, но для доставки генетического материала *in vivo* этот подход мало пригоден.

Трансфекция с использованием хитозана. Хитозан – полимерный полисахарид, состоящий из повторяющихся единиц *D*-глюкозамина и *N*-аце-

Таблица 1. Способы доставки векторов экспрессии на основе ДНК и РНК *in vitro* и *in vivo*

| Метод | Принцип | Преимущества | Недостатки |
|-----------------------|--|---|---|
| Электропорация | Проникновение НК происходит под воздействием серии коротких электрических импульсов | Простота проведения процедуры; низкая стоимость; широкий выбор электродов; может быть применена как <i>in vitro</i> , так и <i>in vivo</i> | Требуется специализированное оборудование; процедура сопровождается повреждением клеток/тканей |
| Биолистика | Частицы металла, покрытые молекулами НК разгоняют за счет импульса инертного газа, после чего частицы металла пробивают клеточную мембрану | Высокая эффективность трансфекции; возможность одновременной доставки разных векторов; широкий спектр объектов модификации; применимость <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> | Высокая стоимость генной пушки и последующей эксплуатации; высокий уровень повреждения клеток в результате процедуры трансфекции; в условиях <i>in vivo</i> доступно ограниченное количество тканей |
| Сонопорация | Перенос НК за счет воздействия на клетки ультразвуковыми волнами | Высокая скорость и эффективность трансфекции в условиях <i>in vitro</i> ; высокая выживаемость клеток; применимость <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> | Наличие аппаратуры; ограниченность применения и более низкая эффективность в условиях <i>in vivo</i> |
| Фототрансфекция | Локальное разрушение клеточной мембраны короткими импульсами лазера | Метод применим к клеткам, растущим и в суспензии, и в адгезии; низкий уровень цитотоксичности | Применим только <i>in vitro</i> ; низкая эффективность трансфекции относительно других физических методов; низкая пропускная способность; трудоемкость |
| Фосфат кальция | Поглощение клетками комплексов, состоящих из НК и фосфата кальция | Простота проведения процедуры; низкая стоимость | Низкая эффективность трансфекции; Выраженная цитотоксичность; применимость только в условиях <i>in vitro</i> |
| Поли- <i>L</i> -лизин | Поглощение клетками комплексов, состоящих из НК и полимера на основе <i>L</i> -лизина | Легко модифицируем под нужды экспериментатора; применимость как <i>in vivo</i> , так <i>in vitro</i> | Низкая эффективность трансфекции; образующиеся комплексы имеют разный размер; комплекс поли- <i>L</i> -лизина без добавления модификаций имеет выраженную цитотоксичность |
| Полиэтиленмин | Поглощение клетками комплексов, состоящих из НК и полимера на основе полиэтиленмина | Высокая эффективность трансфекции в условиях <i>in vitro</i> | Высокая цитотоксичность. Применимость преимущественно в условиях <i>in vitro</i> |
| Хитозан | Поглощение клетками комплексов, состоящих из НК и полимера на основе хитозана | Низкая цитотоксичность; применимость как <i>in vivo</i> так <i>in vitro</i> | Низкая эффективность трансфекции |
| Липофекция | Поглощение клетками комплексов, состоящих из НК и смеси липидов | Высокий уровень трансфекции; применимость как <i>in vivo</i> так <i>in vitro</i> ; легко модифицируется под нужды экспериментатора | Высокая цитотоксичность; образующиеся комплексы имеют разный размер |

Примечание. НК – нуклеиновая кислота.

тил-D-глюкозамина. При pH 6.5 хитозан протонируется и становится растворимым в воде. После обработки он приобретает высокий положительный заряд. Как и прочие катионные полимеры, хитозан образует комплексы с отрицательно заряженной нуклеиновой кислотой. Этот полимер содержит две гидроксильные группы, которые легко модифицируются под задачи исследователя [64]. Механизм проникновения хитозана в клетки такой же, как и у ПЭИ или комплексов поли-L-лизина. В отличие от других полимеров хитозан имеет низкую цитотоксичность, однако и эффективность трансфекции с использованием этого полисахарида значительно уступает другим вариантам трансфекции. Трансфекция с использованием хитозана рассматривается как перспективная альтернатива ПЭИ. Низкая цитотоксичность и возможность модификации делают хитозан довольно удобной платформой. И, хотя проводятся исследования, посвященные повышению эффективности трансфекции с использованием этого полимера, приемлемый уровень эффективности ПЭИ пока не достигнут [65].

Липофекция. В основе липофекции лежит доставка ДНК и РНК в составе липидных комплексов. Для создания комплексов используют положительно заряженные липиды и отрицательно заряженные нуклеиновые кислоты. В качестве примера можно рассмотреть первый коммерчески доступный препарат Lipofectin[®], состоящий из положительно заряженного липида DOTMA и нейтрального липида DOPE. На сегодняшний день трансфекцию проводят с различными липидами, которые различаются свойствами и степенью воздействия на клетки. В частности, такие липиды, как DOTAP и DODAP, используемые для получения липосом YSK05, значительно менее цитотоксичны, чем компоненты Lipofectin[®], а липидный дендример MVLBG2 имеет высокий положительный заряд за счет чего хорошо взаимодействует с ДНК [66]. При смешивании нуклеиновой кислоты и катионного липида образуются липидные везикулы, содержащие ДНК или РНК. Суммарный заряд везикулы должен быть положительным, так как взаимодействие с клеточной мембраной происходит также за счет электростатических сил. Везикулы поглощаются клетками путем эндоцитоза. Липофекция обеспечивает высокий уровень трансфекции клеток *in vitro*, но вместе с тем обладает высокой цитотоксичностью, особенно, если говорить о таком классическом варианте, как Lipofectin[®] [67]. Еще один недостаток — высокая гетерогенность размеров комплексов, образующихся при получении везикул. Считается, что эта гетерогенность негативно сказывается на эффективности трансфекции. Однако простота химического синтеза и модификации катионных липидов делают этот подход очень гибким. К примеру, можно получить ли-

пидные наночастицы (LNP), которые “растворяются” при понижении pH после попадания везикул в лизосомы, что увеличивает эффективность трансфекции. LNP получают с использованием ионизируемого липида, полиэтиленгликоля, вспомогательного фосфолипида и холестерина. Ключевым компонентом является ионизируемый липид: при физиологических значениях pH он имеет нейтральный заряд, но при проникновении в эндосомы с кислым pH становится катионным. Изменение заряда частицы приводит к разрушению эндосом и высвобождению нуклеиновых кислот [68]. Этот подход применим *in vivo*, с его помощью осуществили нокаун гена *Angptl3* в печени мышей [41]. Липофекция, несмотря на свою выраженную цитотоксичность, позволяет проводить трансфекцию с высокой эффективностью. К тому же возможность модификации каждого звена катионного липида и комплекса в целом делает этот метод очень гибким.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами рассмотрены структурные элементы экспрессионных векторов на основе ДНК и синтетических мРНК, а также способы их доставки как *in vitro*, так и *in vivo*. Оптимально подобранные структурные компоненты таких векторов позволяют эффективно экспрессировать терапевтические белки, а также инструменты генного редактирования как в клетках, так и в тканях для успешного выполнения задач генной терапии. Благодаря выбору между векторными платформами, их структурными элементами и способами доставки трансгенов, в настоящее время существует возможность решения целого спектра экспериментальных биомедицинских и терапевтических задач, что подтверждается растущим количеством научных данных, а также результатами доклинических и клинических испытаний по использованию генных редакторов для коррекции наследственных и приобретенных патологий.

Работа выполнена при поддержке программы Министерства высшего образования и науки РФ (соглашение №. 075-10-2021-113, уникальный номер проекта RF—193021X0001).

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. Wang T.Y., Guo X. (2020) Expression vector cassette engineering for recombinant therapeutic production in mammalian cell systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**(13), 5673–5688.

2. Romanova N., Noll T. (2018) Engineered and natural promoters and chromatin-modifying elements for recombinant protein expression in CHO cells. *Biotechnol. J.* **13**(3), 1700232.
3. Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. (2010) Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Develop. Biol.* **339**(2), 225–229.
4. Wise T.G., Schafer D.J., Lambeth L.S., Tyack S.G., Bruce M.P., Moore R.J., Doran T.J. (2007) Characterization and comparison of chicken U6 promoters for the expression of short hairpin RNAs. *Animal Biotechnol.* **18**(3), 153–162.
5. Thaisuchat H., Baumann M., Pontiller J., Hesse F., Ernst W. (2011) Identification of a novel temperature sensitive promoter in CHO cells. *BMC Biotechnol.* **11**(1), 1–12.
6. Jeong H.J., Jung K.H. (2015) Rice tissue-specific promoters and condition-dependent promoters for effective translational application. *J. Integrative Plant Biol.* **57**(11), 913–924.
7. Li W., Notani D., Rosenfeld M.G. (2016) Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives. *Nat. Rev. Genet.* **17**(4), 207–223.
8. Wang X., Cairns M.J., Yan J. (2019) Super-enhancers in transcriptional regulation and genome organization. *Nucl. Acids Res.* **47**(22), 11481–11496.
9. Daramola O., Stevenson J., Dean G., Hatton D., Pettman G., Holmes W., Field R. (2014) A high-yielding CHO transient system: coexpression of genes encoding EBNA-1 and GS enhances transient protein expression. *Biotechnol. Progr.* **30**(1), 132–141.
10. Kozak M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* **234**(2), 187–208.
11. Makrides S.C. (2003) Vectors for gene expression in mammalian cells. *New Comprehensive Biochem.* **38**, 9–26.
12. Hunter M., Yuan P., Vavilala D., Fox M. (2019) Optimization of protein expression in mammalian cells. *Curr. Protocols Protein Sci.* **95**(1), e77.
13. Ho S.C., Bardor M., Feng H., Tong Y.W., Song Z., Yap M.G., Yang Y. (2012) IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines. *J. Biotechnol.* **157**(1), 130–139.
14. Rasala B.A., Lee P.A., Shen Z., Briggs S.P., Mendez M., Mayfield S.P. (2012) Robust expression and secretion of xylanase I in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. *PLoS One.* **7**(8), e43349.
15. Le Fourn V., Girod P.A., Buceta M., Regamey A., Mermoud N. (2014) CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion. *Metabolic Engin.* **21**, 91–102.
16. Cesareni G., Helmer-Citterich M., Castagnoli L. (1991) Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet.* **7**(7), 230–235.
17. Zou J., Maeder M.L., Mali P., Pruetz-Miller S.M., Thibodeau-Beganny S., Chou B.K., Cheng L. (2009) Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* **5**(1), 97–110.
18. Gammage P.A., Rorbach J., Vincent A.I., Rebar E.J., Minczuk M. (2014) Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Mol. Med.* **6**(4), 458–466.
19. Schmid-Burgk J.L., Schmidt T., Kaiser V., Höning K., Hornung V. (2013) A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat. Biotechnol.* **31**(1), 76–81.
20. Kim Y.H., Kim H.O., Baek E.J., Kurita R., Cha H.J., Nakamura Y., Kim H. (2015) Rh D blood group conversion using transcription activator-like effector nucleases. *Nat. Commun.* **6**(1), 1–13.
21. O’Keeffe Ahern J., Lara-Sáez I., Zhou D., Murillas R., Bonafont J., Mencía Á., Wang W. (2021) Non-viral delivery of CRISPR-Cas9 complexes for targeted gene editing via a polymer delivery system. *Gene Therapy.* **29**, 157–170.
22. Lin S., Hirayama D., Maryu G., Matsuda K., Hino N., Deguchi E., Matsuda M. (2022) Redundant roles of EGFR ligands in the ERK activation waves during collective cell migration. *Life Sci. Alliance.* **5**(1), e202101206.
23. Gabriel C.H., Gross F., Karl M., Stephanowitz H., Hennig A.F., Weber M., Baumgrass R. (2016) Identification of novel nuclear factor of activated T cell (NFAT)-associated proteins in T cells. *J. Biol. Chem.* **291**(46), 24172–24187.
24. Jackson R.J., Hellen C.U., Pestova T.V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**(2), 113–127.
25. Grier A.E., Burleigh S., Sahni J., Clough C.A., Cardot V., Choe D.C., Jacoby K. (2016) pEVL: a linear plasmid for generating mRNA IVT templates with extended encoded poly(A) sequences. *Mol. Therapy—Nucl. Acids.* **5**, 306.
26. Ramanathan A., Robb G.B., Chan S.H. (2016) mRNA capping: biological functions and applications. *Nucl. Acids Res.* **44**(16), 7511–7526.
27. Stepinski J., Waddell C., Stolarski R., Darzynkiewicz E., Rhoads R.E. (2001) Synthesis and properties of mRNAs containing the novel “anti-reverse” cap analogs 7-methyl (3'-O-methyl) GpppG and 7-methyl (3'-deoxy) GpppG. *RNA.* **7**(10), 1486–1495.
28. Kariko K., Weissman D. (2007) Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.* **10**(5), 523.
29. Mahiny A.J., Dewerth A., Mays L.E., Alkhaled M., Mothes B., Malaeksefat E., Kormann M.S. (2015) *In vivo* genome editing using nuclease-encoding

- mRNA corrects SP-B deficiency. *Nat. Biotechnol.* **33**(6), 584–586.
30. Karikó K., Muramatsu H., Ludwig J., Weissman D. (2011) Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. *Nucl. Acids Res.* **39**(21), e142.
31. Gustafsson C., Govindarajan S., Minshull J. (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* **22**(7), 346–353.
32. Chatterjee S., Pal J.K. (2009) Role of 5'-and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol. Cell.* **101**(5), 251–262.
33. Babendure J.R., Babendure J.L., Ding J.H., Tsien R.Y. (2006) Control of mammalian translation by mRNA structure near caps. *RNA.* **12**(5), 851–861.
34. Trepotec Z., Aneja M.K., Geiger J., Hasenpusch G., Plank C., Rudolph C. (2019) Maximizing the translational yield of mRNA therapeutics by minimizing 5'-UTRs. *Tissue Engin. Part A.* **25**(1–2), 69–79.
35. von Niessen A.G.O., Poleganov M.A., Rechner C., Plaschke A., Kranz L.M., Fesser S., Sahin U. (2019) Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Mol. Therapy.* **27**(4), 824–836.
36. Eckmann C.R., Rammelt C., Wahle E. (2011) Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* **2**(3), 348–361.
37. Finn J.D., Smith A.R., Patel M.C., Shaw L., Youniss M.R., van Heteren J., Morrissey D.V. (2018) A single administration of CRISPR/Cas9 lipid nanoparticles achieves robust and persistent *in vivo* genome editing. *Cell Rep.* **22**(9), 2227–2235.
38. Miller J.B., Zhang S., Kos P., Xiong H., Zhou K., Perelman S.S., Siegwart D.J. (2017) Non-viral CRISPR/Cas gene editing *in vitro* and *in vivo* enabled by synthetic nanoparticle co-delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. *Angewandte Chemie.* **129**(4), 1079–1083.
39. Liu J., Chang J., Jiang Y., Meng X., Sun T., Mao L., Wang M. (2019) Fast and efficient CRISPR/Cas9 genome editing *in vivo* enabled by bioreducible lipid and messenger RNA nanoparticles. *Adv. Materials.* **31**(33), 19025.5.
40. Stadelmann C., Di Francescantonio S., Marg A., Müthel S., Spuler S., Escobar H. (2022) mRNA-mediated delivery of gene editing tools to human primary muscle stem cells. *Mol. Therapy—Nucl. Acids.* **28**, 47–57.
41. Qiu M., Glass Z., Chen J., Haas M., Jin X., Zhao X., Xu Q. (2021) Lipid nanoparticle-mediated codelivery of Cas9 mRNA and single-guide RNA achieves liver-specific *in vivo* genome editing of Angptl3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **118**(10), e2020401118.
42. Andreason G.L., Evans G.A. (1988) Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques.* **6**(7), 650–660.
43. Herrero M.J., Sendra L., Miguel A., Aliño S.F. (2017) Physical methods of gene delivery. In: *Safety and Efficacy of Gene-Based Therapeutics for Inherited Disorders*. Ed. Brunetti-Pierrri N. Cham: Springer, 113–135.
44. Young J.L., Dean D.A. (2015) Electroporation-mediated gene delivery. *Adv. Genetics.* **89**, 49–88.
45. Shinmyo Y., Tanaka S., Tsunoda S., Hosomichi K., Tajima A., Kawasaki H. (2016) CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation. *Sci. Rep.* **6**(1), 1–13.
46. Uchida M., Li X.W., Mertens P., Alpar H.O. (2009) Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subjects.* **1790**(8), 754–764.
47. Yen M.C., Lai M.D. (2013) Biolistic DNA delivery to mice with the low pressure gene gun. In: *Methods Mol. Biol.* Totowa: Humana Press, **940**, 169–174.
48. Maschietto M., Dal Maschio M., Girardi S., Vassanelli S. (2021) *In situ* electroporation of mammalian cells through SiO₂ thin film capacitive microelectrodes. *Sci. Rep.* **11**(1), 1–11.
49. Tomizawa M., Shinozaki F., Motoyoshi Y., Sugiyama T., Yamamoto S., Sueishi M. (2013) Sonoporation: gene transfer using ultrasound. *World J. Methodol.* **3**(4), 39.
50. Belling J.N., Heidenreich L.K., Tian Z., Mendoza A.M., Chiou T.T., Gong Y., Jonas S.J. (2020) Acoustofluidic sonoporation for gene delivery to human hematopoietic stem and progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**(20), 10976–10982.
51. Ryu J.Y., Won E.J., Lee H.A.R., Kim J.H., Hui E., Kim H.P., Yoon T.J. (2020) Ultrasound-activated particles as CRISPR/Cas9 delivery system for androgenic alopecia therapy. *Biomaterials.* **232**, 119736.
52. Tirlapur U.K., König K. (2002) Targeted transfection by femtosecond laser. *Nature.* **418**(6895), 290–291.
53. Mthunzi P., Dholakia K., Gunn-Moore F.J. (2010) Phototransfection of mammalian cells using femtosecond laser pulses: optimization and applicability to stem cell differentiation. *J. Biomed. Optics.* **15**(4), 041507.
54. Thobakgale L., Manoto S., Lemboumba S.O., Maaiza M., Mthunzi-Kufa P. (2018) Femtosecond laser assisted photo-transfection and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Opt. Interact. Tissue and Cells. Internat. Soc. Optics Photonics.* **10492**, 1049205.
55. Graham F.L., van der Eb A.J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* **52**(2), 456–467.
56. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. (2019) Calcium phosphate-mediated transfection of eukaryotic cells with plasmid DNAs. *Cold Spring Harbor Protocols.* **2019**(10), 095430.
57. Luo D., Saltzman W.M. (2000) Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* **18**(1), 33–37.
58. Guo L., Wang L., Yang R., Feng R., Li Z., Zhou X., Xu X. (2017) Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**(3), 622–629.

59. Patil S.D., Rhodes D.G., Burgess D.J. (2005) DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J.* **7**(1), e61–e77.
60. Zhang M., Hong Y., Chen W., Wang C. (2017) Polymers for DNA vaccine delivery. *ACS Biomaterials Sci. Engin.* **3**(2), 108–125.
61. Ryu N., Kim M.A., Park D., Lee B., Kim Y.R., Kim K.H., Kim U.K. (2018) Effective PEI-mediated delivery of CRISPR-Cas9 complex for targeted gene therapy. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **14**(7), 2095–2102.
62. Rohiwal S.S., Dvorakova N., Klima J., Vaskovicova M., Senigl F., Slouf M., Stieger K. (2020) Polyethylenimine based magnetic nanoparticles mediated non-viral CRISPR/Cas9 system for genome editing. *Sci. Rep.* **10**(1), 1–12.
63. Asayama S. (2020) Molecular design of polymer-based carriers for plasmid DNA delivery *in vitro* and *in vivo*. *Chem. Lett.* **49**(1), 1–9.
64. Критченков А.С., Andranovitš S., Скорик Ю.А. (2017) Хитозан и его производные: векторы в генной терапии. *Усп. химии.* **86**(3) 231–239.
65. Cao Y., Tan Y.F., Wong Y.S., Liew M.W.J., Venkatraman S. (2019) Recent advances in chitosan-based carriers for gene delivery. *Marine Drugs.* **17**(6), 381.
66. Тараховский Ю.С. (2009) Трансфекция клеток ДНК-липидными комплексами-липоплексами. *Биохимия.* **74**(12), 1589–1602.
67. Kumar Y., Kuche K., Swami R., Katiyar S.S., Chaudhari D., Katare P.B., Jain S. (2020) Exploring the potential of novel pH sensitive lipoplexes for tumor targeted gene delivery with reduced toxicity. *Intern. J. Pharmaceutics.* **573**, 118889.
68. Cullis P.R., Hope M.J. (2017) Lipid nanoparticle systems for enabling gene therapies. *Mol. Therapy.* **25**(7), 1467–1475.

Structural Elements of DNA and RNA Eukaryotic Expression Vectors for *in vitro* and *in vivo* Genome Editors Delivery

A. A. Zagoskin¹, M. V. Zakharova¹, and M. O. Nagornykh^{1, 2, *}

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

²*Sirius University of Science and Technology, Sirius, Sochi, 354349 Russia*

*e-mail: derbanner@gmail.com

Gene editing with programmable nucleases widely open new perspectives in such an important practical areas as healthcare and agriculture. The most challenging question for safe and effective therapeutic use of gene editing technologies is how to properly deliver and express gene editors within certain cells and tissues of different organisms. Virus-based and non-virus expression systems can be used for the successful delivery of gene editors. Here we will review delivery methods and structural elements for proper design of DNA and RNA vectors for *in vitro* and *in vivo* expression of gene editors.

Keywords: expression DNA vector, IVT RNA, mRNA-based delivery, genome editing, Cas9, ZFN, TALEN, gene therapy, nanoparticles

УДК 576.32/36:577.35

ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ FLIM-ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ

© 2022 г. А. В. Мамонтова^а, *, Т. Р. Симонян^а, А. М. Богданов^б^аЦентр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия^бИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*e-mail: sphingozin@gmail.com

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 12.04.2022 г.

Принята к публикации 25.04.2022 г.

На основе флуоресцентных белков создано большое число генетически кодируемых индикаторов, позволяющих детектировать изменения различных параметров: мембранного потенциала, рН, концентраций пероксида водорода, лактата, пирувата, NAD^+/NADH , АТФ, катионов кальция и других. Некоторые из них (например, индикаторы катионов кальция и пероксида водорода) успешно применяются многочисленными группами исследователей в экспериментах *in vivo*. Фундаментальным ограничением большинства флуоресцентных индикаторов считается их способность лишь качественно оценивать изменение исследуемого параметра в клетке. Природа этого недостатка состоит в том, что сопоставление абсолютной величины измеряемого параметра и детектируемого флуоресцентного сигнала по разным причинам затруднительно. Количественные измерения предъявляют к сигналу индикатора дополнительное требование: он не должен зависеть от технических особенностей постановки эксперимента (таких как уровень экспрессии белка, тип и мощность источника возбуждения, набор флуоресцентных фильтров и т.д.). Выполнение этого требования может быть связано с детекцией сигнала индикаторов во временном домене, где основной характеристикой сигнала служит время жизни флуоресценции. Время жизни флуоресценции — это абсолютная величина, нечувствительная к изменению интенсивности источника возбуждения, настройкам детектирования, потерям в оптическом тракте или образце, изменению концентрации флуорофора в образце, фотообесцвечиванию. Таким образом, при калибровке индикатора во временном домене конкретному значению измеряемого параметра сопоставляется конкретная величина времени жизни флуоресценции. Времяразрешенный режим визуализации накладывает свои ограничения на свойства флуоресцентного ядра индикатора. Так, время жизни его флуоресценции должно изменяться пропорционально величине измеряемого параметра, что характерно не для всякого флуорофора. В представленной работе мы даем краткий обзор принципов детекции флуоресцентного сигнала генетически кодируемых индикаторов, делая акцент на актуальных подходах, связанных с анализом времяразрешенных данных.

Ключевые слова: флуоресцентные индикаторы, время жизни флуоресценции, FLIM**DOI:** 10.31857/S0026898422050093

ВВЕДЕНИЕ

С момента клонирования гена зеленого флуоресцентного белка, выделенного из медузы *Aequorea victoria* (avGF), в начале 1990-х флуоресцентные белки (ФБ) стали незаменимым инструментом в биологии. Среди ключевых методов флуоресцентного анализа с использованием ФБ особое место занимает визуализация молекулярных индикаторов. Детекция их сигнала может происходить как в спектральном домене (измерение интенсивности флуоресценции), так и во временном домене (измерение времени жизни флуоресценции при помощи микроскопии визуализации — Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM).

ТИПЫ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ИНДИКАТОРОВ В СПЕКТРАЛЬНОМ ДОМЕНЕ

С точки зрения характера флуоресцентного ответа генетически кодируемые индикаторы можно разделить на группы как по типу регистрации флуоресцентного ответа, так и по архитектуре химерной молекулы (рис. 1). По типу регистрации ответа индикаторы можно условно разделить на две группы. Представители первой из них — так называемые интенсивметрические индикаторы — характеризуются простым изменением интенсивности флуоресценции в ответ на изменение исследуемого параметра. Радиометрические индикаторы,

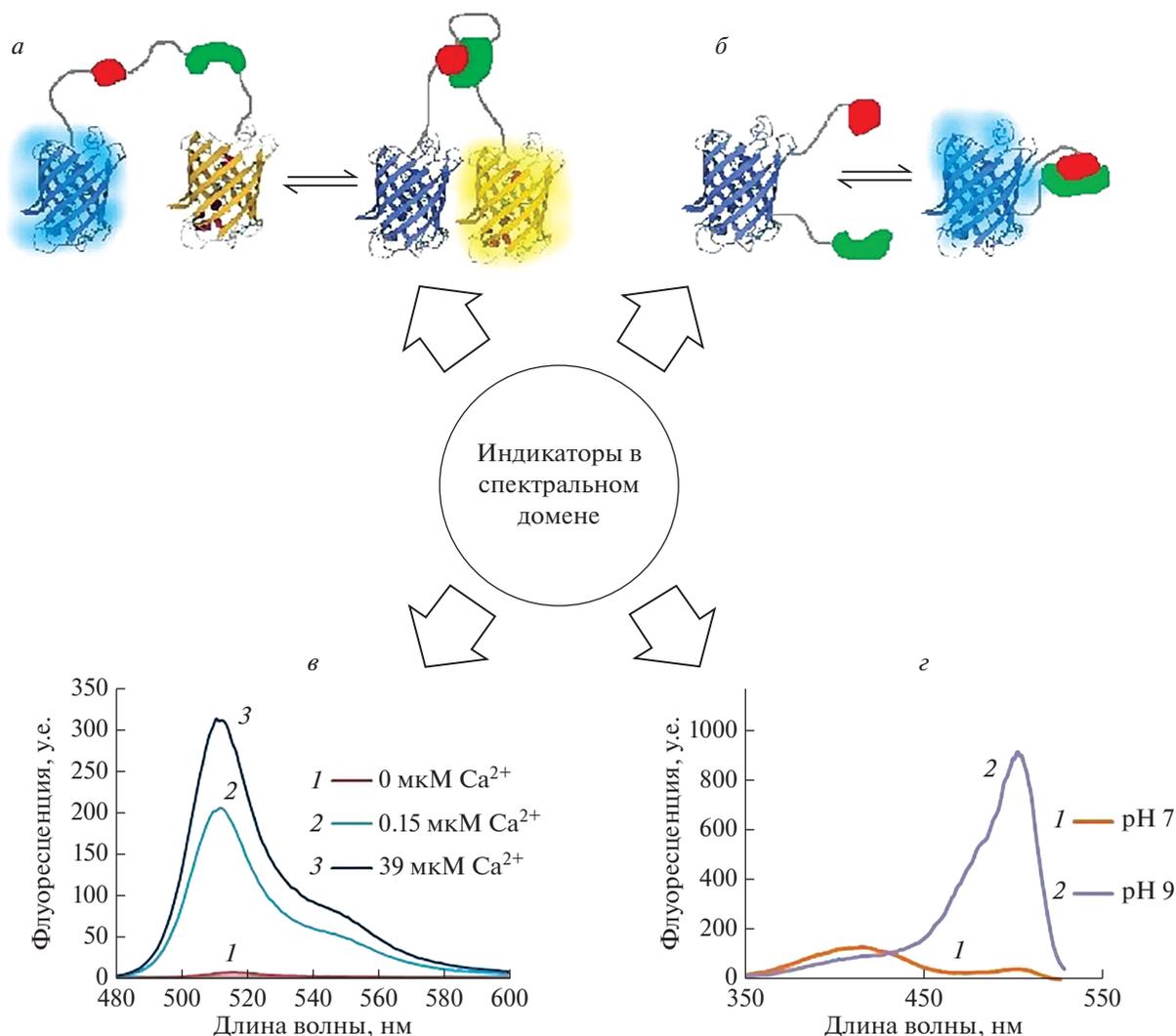


Рис. 1. Основные типы генетически кодируемых флуоресцентных индикаторов. Вверху показаны варианты молекулярного дизайна на основе FRET (*а*) и циркулярно пермутированного флуоресцентного белка (*б*). Красным и зеленым показаны два взаимодействующих друг с другом исследуемых белка. Внизу показаны варианты регистрации флуоресцентного сигнала индикаторов. Пример флуоресцентного ответа интенсимоетрического индикатора кальция: показано изменение спектра эмиссии флуоресценции индикатора в ответ на изменение концентрации кальция (*в*). Пример флуоресцентного ответа радиометрического индикатора pH: показаны спектры возбуждения флуоресценции при различных значениях pH (*г*).

составляющие вторую группу, обладают более сложной характеристикой ответа: например, изменением соотношения амплитуд пиков возбуждения флуоресценции на разных длинах волн. Индикаторы обеих групп имеют похожую молекулярную организацию: флуоресцентный белок (рис. 1б) или FRET-пара (рис. 1а) соединен с чувствительным доменом, претерпевающим значительные конформационные сдвиги в ответ на специфическую стимуляцию. Примечательно, что в качестве флуоресцентного ядра вместо обычных ФБ могут применяться конформационно лабильные циркулярно пермутированные ФБ. Такие белки сохраняют типичную для ФБ третичную структуру β -бочки, но обладают измененной то-

пологией полипептидной цепи. Оригинальные N- и C-концы пермутанта соединены коротким пептидным линкером, а новые концы расположены на “боку” бочки, рядом с хромофором. Такая манипуляция позволяет снизить стабильность аминокислотного окружения хромофора по сравнению с таковой для интактного ФБ.

На сегодняшний день имеются как интенсимоетрические, так и радиометрические флуоресцентные индикаторы с удачным набором практических характеристик [1].

Однако даже наиболее продвинутые варианты флуоресцентных индикаторов пригодны лишь для регистрации относительного изменения изу-

чаемого параметра. Принципиально новые возможности в применении этих молекулярных инструментов мы связываем с количественной детекцией аналита, которая, в свою очередь, могла бы осуществляться при анализе флуоресцентного сигнала во временном домене вместо спектрального.

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ВРЕМЯРАЗРЕШЕННОЙ МИКРОСКОПИИ

За последние десятилетия микроскопия времени жизни флуоресценции совершила качественный технологический скачок. Так, фирма “Becker & Hickl GmbH” (Германия), один из лидеров по разработке и производству устройств для время-разрешенной микроскопии, выпустила на рынок десятки новых приборов и соответствующих программных решений (<https://www.beckerhickl.com/>). Важно, что при этом уровень цен на такое оборудование неуклонно снижается, поэтому время-разрешенная микроскопия становится доступной широкому кругу лабораторий. Растет и число публикаций биомедицинской тематики, в материалах которых описано поведение флуорофоров во временном домене. Так, поисковая выдача базы данных PubMed по запросу “fluorescence lifetime” составляет более 7000 статей, опубликованных за последние 10 лет.

В микроскопии визуализации времени жизни флуоресценции, FLIM, кинетика наносекундного распада электронного возбужденного состояния хромофоров, характеризующаяся временем жизни флуоресценции (τ), отображается пространственно с помощью микроскопа, оборудованного детектором, способным к высокочастотной модуляции, или скоррелированным во времени счетчиком фотонов. Преимущество измерения времени жизни флуоресценции хромофоров состоит в том, что этот параметр напрямую зависит от реакции в возбужденном состоянии, но не зависит от концентрации хромофора и длины оптического пути – условий, которые трудно контролировать внутри клетки [2]. Таким образом, характер затухания флуоресценции флуорофора в конкретной физико-химической среде можно считать внутренним свойством, слабо зависящим от инструментального аспекта измерения [2], что облегчает и делает целесообразным его количественный анализ.

На сегодняшний день существует относительно немного индикаторов с регистрацией сигнала во временном домене. Так, созданы флуоресцентные FLIM-индикаторы на основе органических красителей для измерения pH [3] и концентрации катионов натрия [4] в клетке, мембранного потенциала [5]. На основе квантовых точек [6] создана система для измерения внутриклеточного pH. Интересен подход с использованием в качестве индикатора эндогенного FAD, время жизни флуоресценции которого, как было показано,

зависит от pH [7]. Генетически кодируемые индикаторы с детекцией сигнала во временном домене пока немногочисленны. Так, описано измерение концентрации кальция при помощи варианта индикатора GCaMP на основе голубого флуоресцентного белка Turquoise 2 с динамическим диапазоном ответа 1.5 нс [8]. Исследовано поведение нескольких индикаторов мембранного потенциала на основе флуоресцентных белков (ASAP1, CAESR и ArcLight) во временном домене [9]. Также создан целый ряд индикаторов для измерения внутриклеточного pH [10–15]. Например, описана pH-чувствительность голубого белка ECFP [10], ряда мутантов avGFP [11, 12] и мутанта красного белка mKeima [13] во временном домене. Интересен и индикатор pH-Lemon на основе FRET-пары mTurquoise2 и EYFP [14]. Отдельно следует отметить pH-индикаторы SypHer3s и SypHerExtra, подходящие как для измерения pH в цитоплазме (SypHer3s), так и во внеклеточном примембранном пространстве (SypHerExtra) [15].

За редкими исключениями [3, 10] эксперименты во временном домене из перечисленных выше работ сводились к регистрации относительных изменений целевого параметра на основе измерения времени жизни флуоресценции без оценки его абсолютной величины. Следует также отметить, что в своем большинстве FLIM-индикаторы на основе флуоресцентных белков [8–10, 12–14] первоначально предназначались для использования в спектральном домене, поэтому в условиях время-разрешенной визуализации показывают сравнительно узкий динамический диапазон флуоресцентного ответа, не превышающий 1.5 нс (а чаще – сотни пикосекунд [9, 12, 13]), что существенно затрудняет количественное определение исследуемого параметра. Для сравнения, индикаторы на основе квантовых точек характеризуются динамическим диапазоном до 7 нс [6]. Важным фактором, определяющим возможности рационального дизайна FLIM-индикаторов, считается установление и изучение молекулярных детерминант чувствительности времени жизни флуоресценции к внешним физико-химическим воздействиям. В случае генетически кодируемых индикаторов определяющее значение в частности может иметь идентификация и/или получение вариантов белков, характеризующихся переменной конформационной стабильностью хромофора в возбужденном электронном состоянии [2].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание генетически кодируемых индикаторов для измерения ключевых внутриклеточных параметров с регистрацией сигнала во временном домене и возможностью количественного сопоставления флуоресцентного ответа с абсолютной величиной измеряемого параметра – актуальная

экспериментальная задача. Ее решение существенно расширяет функциональные возможности флуоресцентной визуализации в биологических системах и открывает новые горизонты для исследователей физиологии и биохимии живой клетки. С нашей точки зрения, прогресс в области количественного флуоресцентного анализа живых систем будет определяться в равной степени новыми технологическими решениями для времяразрешенной микроскопии и успехами в расшифровке структурно-химических детерминант времени жизни флуоресценции соответствующих флуорофоров.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований — грантом 19-34-60019 (руководитель А.В.М.).

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

Все авторы внесли равный вклад в написание статьи и заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sanford L., Palmer A. (2017) Recent advances in development of genetically encoded fluorescent sensors. *Methods Enzymol.* **589**, 1–49.
- Berezin M.Y., Achilefu S. (2010) Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem. Rev.* **110**, 2641–2684.
- Lin H.-J., Herman P., Lakowicz J.R. (2003) Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. *Cytometry.* **52A**, 77–89.
- Meyer J., Untiet V., Fahlke C., Gensch T., Rose C.R. (2019) Quantitative determination of cellular [Na⁺] by fluorescence lifetime imaging with CoroNaGreen. *J. Gen. Physiol.* **151**, 1319–1331.
- Lazzari-Dean J.R., Gest A.M., Miller E.W. (2019) Optical estimation of absolute membrane potential using fluorescence lifetime imaging. *eLife.* **8**, e44522.
- Orte A., Alvarez-Pez J.M., Ruedas-Rama M.J. (2013) Fluorescence lifetime imaging microscopy for the detection of intracellular pH with quantum dot nanosensors. *ACS Nano.* **7**, 6387–6395.
- Islam Md., Honma M., Nakabayashi T., Kinjo M., Ohta N. (2013) pH dependence of the fluorescence lifetime of FAD in solution and in cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1952–1963.
- van der Linden F.H., Mahlandt E.K., Arts J.J.G., Beumer J., Puschhof J., de Man S.M.A., Chertkova A.O., Ponsioen B., Clevers H., van Buul J.D., Postma M., Gadella T.W.J., Jr., Goedhart J. (2021) A turquoise fluorescence lifetime-based biosensor for quantitative imaging of intracellular calcium. *Nat. Commun.* **12**, 7159.
- Brinks D., Klein A.J., Cohen A.E. (2015) Two-photon lifetime imaging of voltage indicating proteins as a probe of absolute membrane voltage. *Biophys. J.* **109**, 914–921.
- Poëa-Guyon S., Pasquier H., Mérola F., Morel N., Erard M. (2013) The enhanced cyan fluorescent protein: a sensitive pH sensor for fluorescence lifetime imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 3983–3987.
- Battisti A., Digman M.A., Gratton E., Storti B., Beltram F., Bizzarri R. (2012) Intracellular pH measurements made simple by fluorescent protein probes and the phasor approach to fluorescence lifetime imaging. *Chem. Commun.* **48**, 5127.
- Schmitt F.-J., Thaa B., Junghans C., Vitali M., Veit M., Friedrich T. (2014) eGFP-pHsens as a highly sensitive fluorophore for cellular pH determination by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Biochim. Biophys. Acta.* **9**, 1581–1593.
- Tantama M., Hung Y.P., Yellen G. (2011) Imaging intracellular pH in live cells with a genetically encoded red fluorescent protein sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10034–10037.
- Burgstaller S., Bischof H., Gensch T., Stryeck S., Gottschalk B., Ramadani-Muja J., Eroglu E., Rost R., Balfanz S., Baumann A., Waldeck-Weiermair M., Hay J.C., Madl T., Graier W.F., Malli R. (2019) pH-lemon, a fluorescent protein-based pH reporter for acidic compartments. *ACS Sens.* **4**, 883–891.
- Goryashchenko A.S., Pakhomov A.A., Ryabova A.V., Romanishkin I.D., Maksimov E.G., Orsa A.N., Serova O.V., Mozhaev A.A., Maksimova M.A., Martynov V.I., Petrenko A.G., Deyev I.E. (2021) FLIM-based intracellular and extracellular pH measurements using genetically encoded pH sensor. *Biosensors.* **11**, 340.

PROSPECTS OF GENETICALLY ENCODED FLIM INDICATORS FOR THE QUANTITATIVE ASSESSMENT OF INTRACELLULAR PARAMETERS

A. V. Mamontova¹*, T. R. Simonyan¹, and A. M. Bogdanov²

¹ Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: sphingozin@gmail.com

A significant number of genetically encoded indicators based on fluorescent proteins have been created that allow detecting changes in various parameters: membrane potential shift, pH, concentrations of hydrogen peroxide, lactate, pyruvate, NAD⁺/NADH, ATP, calcium cations, etc. Some of them (for example, indicators of calcium cations and hydrogen peroxide) are successfully used by numerous groups of researchers in

experiments *in vivo*. The fundamental limitation of most fluorescent indicators is their ability to only qualitatively assess the change in the parameter of interest in the cell. The nature of this limitation is that it is difficult to compare the absolute value of the measured parameter and the detected fluorescent signal for various reasons. Quantitative measurements impose an additional requirement on the indicator signal: it should not depend on the technical features of the experiment (such as the level of protein expression, the type and power of the excitation source, a set of fluorescent filters, etc.). The fulfillment of this requirement may be associated with the detection of the indicator signal in the time domain, where the main characteristic of the signal is the fluorescence lifetime. The fluorescence lifetime is an absolute value, insensitive to changes in the intensity of the excitation source, detection settings, losses in the optical path or sample, changes in the concentration of the fluorophore in the sample, photobleaching. Thus, when calibrating an indicator in the time domain, a specific value of the fluorescence lifetime is associated with a specific value of the measured parameter. The time-resolved imaging mode imposes its own limitations on the properties of the indicator's fluorescent core. Thus, the lifetime of its fluorescence should change in proportion to the value of the measured parameter, which is not a characteristic of any fluorophore. In this work, we make a brief review of the detection principles of the genetically encoded indicators' fluorescent signal, focusing on current approaches related to the analysis of time-resolved data.

Keywords: fluorescent indicators, fluorescence lifetime, FLIM

УДК 577.25,616.8

НАРУШЕНИЕ БЕЛКОВОГО ГОМЕОСТАЗА В КЛЕТКЕ КАК ОСНОВА ПАТОГЕНЕЗА НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2022 г. М. С. Кухарский^{a, b}, М. У. Эверетт^a, О. А. Лыткина^b, М. А. Распопова^b,
Е. А. Ковражкина^c, Р. К. Овчинников^{a, b}, А. И. Антохин^a, А. А. Московцев^{a, d}

^aРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

^bИнститут физиологически активных веществ Российской академии наук,
Московская область, Ногинский район, Черноголовка, 142432 Россия

^cФедеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства,
Москва, 117997 Россия

^dНаучно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

*e-mail: kukharskym@gmail.com

Поступила в редакцию 05.05.2022 г.

После доработки 05.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Образование и накопление в клетке несвернутых, неправильно свернутых или поврежденных белковых молекул приводит к развитию стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР-стресса). В ответ на ЭПР-стресс запускается цепь защитных реакций, направленных на восстановление баланса между образованием и деградацией белков в клетке, что служит основой для поддержания белкового гомеостаза (протеостаза). К главным защитным механизмам при этом относятся следующие: приостановка общего синтеза белка, повышение уровня шаперонов и активация систем деградации белков. В случае недостаточности или нарушений в работе этих механизмов запускается апоптоз. Общим патогенетическим признаком большинства нейродегенеративных заболеваний считается нарушение протеостаза, при котором наблюдается образование продуктов белковой агрегации, вследствие чего происходит гибель клеток в определенных отделах нервной системы. Направленное регулирующее воздействие на сигнальные пути ЭПР-стресса рассматривают в качестве потенциального метода терапии, способного замедлить или даже остановить развитие нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: ЭПР-стресс, агрегация белка, протеостаз, нейродегенеративные заболевания

DOI: 10.31857/S0026898422060143

СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Функциональное разнообразие белков, в том числе их уникальные каталитические свойства, обусловлены сложными трехмерными структурами. Конформация белка определяется его первичной структурой, а также зависит от физико-химических свойств микроокружения и особенностей фолдинга (или укладки) полипептидной цепи. Энергии нековалентных сил, участвующих в поддержании конформации, относительно невелики, благодаря чему конформационные изменения, сопровождающие функционирование белков, происходят относительно легко. Вместе с тем неблаго-

приятные воздействия, даже низкоэнергетические, могут влиять на структуру белка. Это “ставит” перед клеткой сложную задачу поддержания белков в физиологически релевантных конформациях. Этот процесс, или белковый гомеостаз (протеостаз), реализуется в клетке за счет скоординированной работы систем укладки белковых молекул, контроля их качества, механизмов деградации неправильно уложенных или поврежденных белков, а также систем “складирования” белковых агрегатов [1–3]. Кроме того, по нашему мнению, к протеостазу могут быть отнесены пути макромолекулярного обмена клетки с внешней средой: экзоцитоз и эндоцитоз (и его разновидности), — так как приток в клетку и отток из нее белков могут влиять на клеточный протеом. Следует также обратить внимание, что значительная часть белков функционирует в конформационном состоянии, характеризующемся

Сокращения: БАС — боковой амиотрофический склероз; НДЗ — нейродегенеративные заболевания; ОНБ — ответ на несвернутые белки; ЭПР-стресс — стресс эндоплазматического ретикулума.

частичным или даже полным отсутствием стабильных вторичных и третичных структур, а также доменной организации. Так называемые внутренне неупорядоченные области белков и неупорядоченные в целом белки, благодаря относительной “слабости” нековалентных связей, задействованных в поддержании их конформации, существуют и функционируют не в виде одной структуры, а как ансамбль структур [4]. Этот континуум конформаций представляет собой важную часть клеточного протеома, и такие белки, как например частично неупорядоченный шаперон, участвуют также в регуляции протеостаза [5]. Неупорядоченные белки подробно рассмотрены в ряде обзоров (например, см. [6]). Из-за влияния микроокружения на белковые структуры протеостаз ряда клеточных компартментов имеет особенности, в частности свой набор белков-шаперонов [7]. В связи с этим протеостаз многоклеточного организма может быть условно разделен на внеклеточный и внутриклеточный; последний, в свою очередь, включает цитоплазматическую, ядерную системы и системы протеостаза мембранных органелл: эндоплазматического ретикулума (ЭПР), митохондрий и других.

В ЭПР укладку синтезирующихся на экспорт или мембранных полипептидов и пересборку молекул с нарушенной конформацией осуществляет обособленный пул белков-шаперонов ЭПР, а утилизацию — цитоплазматические убиквитин-протеасомная и аутофагосомная системы. Все они обеспечивают контроль качества белков в клетке (protein quality control, PQC) [3, 8]. При дисфункции или насыщении системы укладки белков в ЭПР и/или перегрузке механизма контролируемой деградации белков возникает особое состояние ЭПР-компартамента, называемое стрессом ЭПР (ЭПР-стресс) [9–13]. В таком состоянии ЭПР не может эффективно поддерживать баланс между синтезом и утилизацией образующихся белков, вследствие чего в ЭПР и цитоплазме накапливаются белки в несвернутом состоянии или с нарушенной конформацией. При ЭПР-стрессе образуются промежуточные растворимые продукты агрегации таких белков, причем их концентрация постепенно нарастает. Следует отметить, что при этом из-за временной остановки синтеза белка (см. ниже) в клетке не только блокируется ряд функций, но, кроме того, несвернутые или неправильно свернутые белки могут образовывать агрегаты, токсичные и/или иммуногенные для организма [14]. При появлении таких потенциально патогенных форм белков в клетке активируются определенные защитные механизмы, к которым относится комплекс реакций, получивший название “ответ на несвернутые белки” (Unfolded Protein Response, UPR; ОНБ). Еще один механизм ответа клетки на стресс — это образование стресс-гранул (stress granules). Наруше-

ние клеточного протеостаза в результате накопления aberrантных форм белков в ЭПР — одно из ключевых звеньев патогенеза нейродегенеративных (НДЗ), онкологических, сердечно-сосудистых и других заболеваний [3, 10, 15–18].

К важным защитным механизмам высших эукариот при ЭПР-стрессе относится блокирование, то есть значительное и контролируемое снижение, общего синтеза белка (кепзависимой трансляции) за счет фосфорилирования фактора инициации трансляции eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α); но при этом селективно экспрессируются гены, ответственные за адаптацию и восстановление клеточных функций [9, 17, 18]. Известны и другие механизмы, приводящие к блокировке трансляции. При длительном персистировании или высоком уровне ЭПР-стресса происходит переключение на проапоптотическую программу гибели клетки [19–24].

В мембрану ЭПР интегрированы специальные белки-сенсоры, которые реагируют на увеличение концентрации несвернутых токсичных форм белковых молекул в просвете ЭПР. Эти сенсоры активируются путем аутофосфорилирования и запускают каскад молекулярных событий, направленных на перестройку процессов синтеза и созревания белков, с целью коррекции возникшего дисбаланса протеостаза. Так клетки адаптируются к стрессовым условиям. Для многоклеточных организмов известно три сенсора ЭПР-стресса: PERK-подобная ЭПР-киназа (PERK, protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase) [25], активирующий транскрипционный фактор 6 α (ATF6 α , activating transcription factor 6 α) и его паралог 6 β (ATF6 β) [26] и инозитолзависимая трансмембранная киназа/эндонуклеаза 1 α (IRE1 α , inositol-requiring kinase 1 α) и паралог 1 β (IRE1 β) [27]. Эти белки формируют три относительно независимые ветви стресс-индуцируемого сигнального пути, выполняющего роль сенсора и трансмиттера информации в ядро об увеличении в просвете ЭПР концентрации несвернутых белков или белков с нарушенной конформацией (рис. 1) [17, 18, 28–30].

Известно, что удаление гена, кодирующего IRE1 α (*Ern1*) или XBP1 (*Xbp1*) у мышей, приводит к ранней гибели плода на 12 сутки (E12) эмбрионального развития [31, 32]. Делеция гена, кодирующего другой ключевой сенсор — PERK (*Eif2ak3*), — а также мутации в сайте фосфорилирования eIF2 α приводят к летальному исходу уже после рождения [33–35]. Удаление *Atf6a* не приводит к развитию выраженного фенотипа, однако нарушает адаптивный ответ при развитии ЭПР-стресса [36]. При одновременном нокауте гена *Atf6a* и его паралога *Atf6b* наблюдается ранняя эмбриональная летальность [37].

PERK и IRE1 α — это трансмембранные белки I типа, при этом N-конец молекулы, обращенный

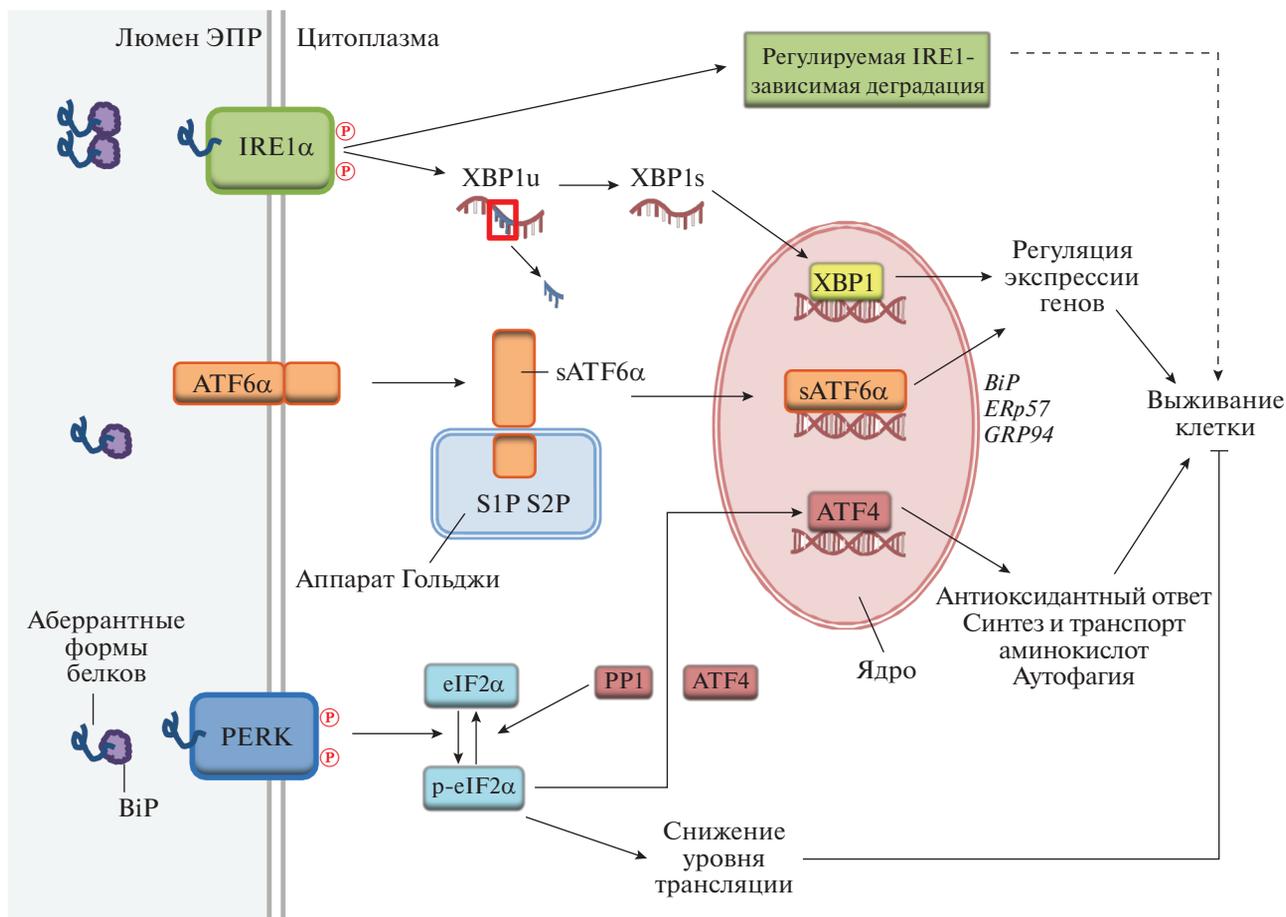


Рис. 1. Сигнальные пути клеточного ответа на несвернутые белки (ОНБ). BiP – иммуноглобулинсвязывающий белок; IRE1 α – инозитолзависимая трансмембранная киназа/эндонуклеаза 1 α ; ATF6 α – активирующий транскрипционный фактор 6 α ; PERK – PKR-подобная протеинкиназа ЭПР-киназа; XBP1u – несплайсированная мРНК X-бок-связывающего белка-1; XBP1s – сплайсированная мРНК X-бок-связывающего белка-1; sATF6 – короткая форма ATF6 α ; S1P – протеаза сайта 1; S2P – протеаза сайта 2; eIF2 α – эукариотический фактор инициации трансляции 2 α ; p-eIF2 α – фосфорилированная форма eIF2 α ; PP1 – протеинфосфатаза-1; ATF4 – активирующий транскрипционный фактор 4; BiP – ген иммуноглобулинсвязывающего белка; ERp57 – ген белка ЭПР 57 кДа; GRP94 – ген регулируемого глюкозой белка 94 кДа. Стрелкой указано стимулирующее действие, перпендикулярной линией – ингибирующее, пунктиром – предполагаемое влияние.

в люмен ЭПР, выполняет функцию сенсора, а на С-конце, обращенном в цитозоль, располагается домен, обладающий Ser/Thr-киназной активностью [38, 39]. Активированная PERK фосфорилирует фактор eIF2 α по Ser51 (фосфорилированная форма – p-eIF2 α), после чего он теряет способность эффективно иницировать трансляцию и, как следствие, происходит снижение синтеза белка в клетке. Дополнительно запускается образование стресс-гранул, выполняющих роль временного хранилища для нетранслируемой мРНК [40–44]. Однако такие условия оказываются более выгодными для трансляции ряда мРНК. В частности, при ЭПР-стрессе усиливается синтез таких белков, как фактор транскрипции ATF4 (activating transcription factor 4), проапоптотический белок CHOP (C/BEP homologous protein) и субъединица GADD34 (growth arrest and DNA

damage-inducible protein) протеинфосфатазы-1 (PP1), которая участвует в дефосфорилировании p-eIF2 α . В 5'-лидерной последовательности таких мРНК расположены дополнительные открытые рамки считывания (upstream open reading frame, uORFs), конфигурация которых определяет относительно низкий уровень их трансляции в нормальных условиях и дает преимущества в условиях, когда инициация обеспечивается фосфорилированной формой eIF2 α [45, 46]. ATF4, поступая в ядро, активирует экспрессию генов, ответственных за синтез и транспорт аминокислот и антиоксидантный ответ. Образует гетеродимер с CHOP, ATF4 активирует транскрипцию генов, регулирующих аутофагию и трансляцию мРНК, а также субъединицы GADD34, которая необходима для дефосфорилирования p-eIF2 α и восстановления белкового синтеза до нормально-

го уровня при выходе клетки из стресса [47, 48]. Следует отметить, что помимо PERK известно еще три киназы, которые способны фосфорилировать eIF2 α . Так, PKR (protein kinase R) активируется при накоплении в клетке двухцепочечной РНК, HRI (heme-regulated eIF2 α kinase) – оксидативным стрессом, GCN2 (general control nonderepressible 2) – недостатком питательных веществ, прежде всего аминокислот [49, 50]. В совокупности система из четырех киназ, активирующихся при различных стрессовых воздействиях, обеспечивает интегративный ответ на стресс (integrated stress response, ISR).

Уникальная псевдокиназа IRE1 α , обладающая эндонуклеазной активностью в активированном состоянии, способна вырезать 26-нуклеотидный интрон из незрелой мРНК белка XBP-1 (X-box-binding protein 1), что приводит к сдвигу рамки считывания и синтезу белка-транскрипционного фактора, регулирующего экспрессию генов, вовлеченных в восстановление гомеостаза ЭПР. IRE1 активирует гены, кодирующие шапероны и белки, участвующие в процессах котрансляционного фолдинга в ЭПР и транспорта, посттрансляционных модификаций и контролируемой деградации. Активация IRE1 α также усиливает деградацию определенных, часто ассоциированных с ЭПР мРНК, тем самым снижая количество образуемого белка в клетке. Описанный процесс получил название “регулируемая IRE1-зависимая деградация” (regulated IRE1-dependent decay, RIDD) [51].

Еще один важный стресс-сенсор – ATF6. ATF6 α – это трансмембранный белок II типа, содержащий на цитозольном N-конце молекулы ДНК-связывающий домен с мотивом основной лейциновой “застежки-молнии” (basic leucine zipper, bZIP) [52]. При активации ATF6 α транспортируется в аппарат Гольджи, где подвергается расщеплению с высвобождением короткой формы (sATF6), которая выполняет функцию транскрипционного фактора, усиливающего экспрессию генов, кодирующих шапероны, например *BiP* (binding immunoglobulin protein), *ERp57* (ER protein 57) и *GRP94* (glucose-regulated protein 94 kDa). Показано, что sATF6 активирует также транскрипцию генов белков, участвующих в процессах контролируемой деградации других белков [53].

Считается, что в ответ на ЭПР-стресс запускаются все три описанные сигнальные ветви, при этом происходит одновременная активация как цитопротекторной, так и проапоптотической программы. Сигналы, стимулирующие апоптоз, запускаются либо при большей выраженности стресса, либо уже после начала реализации защитных механизмов [19, 20, 22, 54, 55]. На начальных этапах ЭПР-стресса преобладают защитные сигналы, чему способствует относительно высокая стабильность (большое время полурас-

пада) мРНК и белков, определяющих такое действие, – например шаперон *BiP* [19]. Проадаптивное значение имеют такие события, как снижение общего уровня трансляции, увеличение числа молекул, участвующих в укладке и деградации белков, тогда как главными стимуляторами клеточной гибели служат такие факторы, как CHOP и GADD34. В режиме адаптации перестройка работы белоксинтезирующего аппарата помогает клетке справиться со стрессом. Если эффективной адаптации не происходит, то баланс сдвигается в сторону клеточной гибели. В качестве возможного механизма для такого переключения J. Lin с соавт. [20] предложили модель, согласно которой длительность активации разных ветвей ОНБ различается, что приводит к постепенному усилению проапоптотических сигналов. В частности показано, что в первую очередь после активации затухает сигнал от IRE1-опосредуемой ветви, даже несмотря на продолжающийся стресс. Активность ATF6-пути также снижается, но менее интенсивно, чем IRE1, тогда как путь PERK продолжает быть активным намного дольше в условиях сохраняющегося стресса. Более того, при искусственном стимулировании IRE1-пути в культуре клеток их выживаемость при ЭПР-стрессе повышается [20]. Взаимодействие между различными ветвями ОНБ указывает на сложный характер регуляции ответа на стресс ЭПР. Так, ген *XBP1* – это мишень транскрипционного фактора ATF6, активация которого происходит достаточно рано и предшествует трансляции XBP-1, что свидетельствует о постепенном разворачивании программы ОНБ во времени [28]. Таким образом, запуск ОНБ в конечном итоге приводит к активации факторов транскрипции и других регуляторных белков, обеспечивающих перестройку клеточного метаболизма с целью адаптации к стрессовым условиям и дальнейшему восстановлению. Однако в случае острого стресса или его длительного персистирования запускается апоптоз – главным образом через сигнальный путь PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP. CHOP активирует экспрессию таких проапоптотических генов, как *DR5*, *TRB3*, *BIM* и *PUMA*, и подавляет экспрессию антиапоптотического *BCL2* [56, 57]. Выступая в роли транскрипционных факторов, ATF4 и CHOP способны реактивировать белковый синтез в клетке, при этом они могут взаимодействовать друг с другом. Белковый синтез в условиях продолжающегося стресса ведет к истощению АТФ и развитию оксидативного стресса, что, в свою очередь, запускает клеточную гибель [47, 58]. На клеточных культурах и на мышиной модели показано, что при делеции гена *Ddit3*, кодирующего CHOP, в условиях ЭПР-стресса накопление белковых агрегатов в ЭПР идет медленнее, снижается оксидативный стресс и замедляется апоптоз [21, 59, 60]. Однако в другой работе пока-

зано, что при индуцировании ЭПР-стресса с помощью туникамицина в мозге мышей, нокаутных по гену *Ddit3*, клеточная гибель усиливается [61]. Схожие результаты были получены при скрещивании линии мышей, не имеющих СНОР, с мышами, моделирующими гипомиелиновую лейкодиетрофию (болезнь Пелицеуса–Мерцбахера) [62]. У потомства было значительно увеличено количество апоптотических клеток в спинном мозге, в частности олигодендроцитов. Наконец, на моделях оптической нейропатии показано, что одновременное “выключение” гена *Ddit3*, кодирующего СНОР, и повышение экспрессии ХВР-1 оказывает цитопротекторное действие [63].

Следует отметить, что СНОР стимулирует активность оксидоредуктазы ERO1 α (ER oxidase 1 α), которая при образовании дисульфидных связей в ЭПР обеспечивает перенос электронов на кислород с формированием перекиси водорода [21, 64]. Эта реакция увеличивает количество активных форм кислорода (АФК) и выход ионов кальция из ЭПР [65]. Ионы кальция, выходящие из ЭПР, могут поступать в митохондрии через ассоциированные между двумя органоидами участками мембраны, что, в свою очередь, приводит к повышению количества АФК за счет таких механизмов, как высвобождение цитохрома *c*, стимулирование дегидрогеназ цикла Кребса и активирование NO-синтазы. Возможно, что приток кальция из ЭПР в митохондрии необходим для усиления биогенеза АТФ – в связи с высоким его “потреблением” при укладке белков [66].

Все три ветви сигнальных путей ОНБ могут влиять на запуск апоптоза (рис. 2). Например, IRE1 при активации формирует комплекс с TRAF2 (TNF- α receptor-associated factor 2), после чего образуется тройственный комплекс – с ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), что в свою очередь активирует JNK (JUN aminoterminal kinase) и направляет клетку в апоптоз [67–69]. Комплекс IRE1-TRAF2 напрямую взаимодействует с каспазой-12 (CASP12), вызывая ее олигомеризацию и активацию [70]. Кроме того, цитозольный домен IRE1 α может взаимодействовать с проапоптотическими белками Bax (Bcl-2-associated X protein) и Bak (Bcl-2 agonist/killer), которые усиливают активность IRE1 α [71]. Через механизм IRE1-зависимой деградации мРНК может происходить деградация мРНК, кодирующих шапероны, а также снижение уровней микроРНК, которые подавляют экспрессию проапоптотических каспаз [24]. Меньше известно о роли ATF6 в активации апоптоза при ЭПР-стрессе. ATF6 индуцирует апоптоз в миобластах мыши через снижение уровня антиапоптотического белка Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) [72, 73], а в клетках желтого тела – через повышение уровня СНОР [74, 75]. Таким образом, ATF6, помимо его роли в поддержании протеостаза, также важен

для регуляции органогенеза [76]. На культуре эндотелиальных клеток показано, что ATF6 снижает уровень антиапоптотического Bcl-2 и активирует JNK [77]. V. Pagliarini с соавт. [78] показали, что ATF6 взаимодействует с промотором гена фактора транскрипции E2F1, снижая его экспрессию и тем самым запуская апоптоз. Примечательно, что при этом снижение уровня E2F1 происходит на поздней стадии реализации ОНБ и сопровождается изменением экспрессии ряда генов, связанных с апоптозом: снижение уровня *BCL2* и *MCL1*, повышение уровня *NOXA* и *PUMA*. Такие изменения стимулируют апоптоз. Тогда как на ранних этапах ОНБ уровни этих белков изменяются в обратном направлении, обеспечивая выживаемость клетки [78]. Исходя из этого, E2F1 может играть роль переключателя при выборе судьбы клетки – в зависимости от силы и характера стресса.

СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Многочисленные исследования последних лет показали, что существует тесная связь между развитием НДЗ и ОНБ. Так, обнаружено, что в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера повышен уровень p-eIF2 α и ATF4 [79], а полиморфизм –116C/G в промоторе гена *XBPI* ассоциирован с повышенным риском развития этого заболевания [80]. У пациентов с болезнью Паркинсона также выявлено наличие активированных p-eIF2 α и p-PERK в нейронах черной субстанции, которые специфически поражаются при паркинсонизме [81]. Более того, в полученных от пациентов с болезнью Паркинсона индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, имеющих мутацию в гене α -синуклеина, обнаружена активация шаперонов и фолдаз, участвующих в ОНБ, а также ХВР-1 [82, 83]. Эти данные подтверждены на линиях генетически модифицированных мышей, экспрессирующих мутантную форму α -синуклеина [82, 83]. Активация всех трех сенсоров ЭПР-стресса, а также некоторых каспаз выявлена у больных со спорадическими формами бокового амиотрофического склероза (БАС) [84–87]. В широко используемой модели трансгенных мышей с эктопической экспрессией мутантного гена *SOD1*^{G93A} также наблюдалась активация ОНБ уже на пресимптоматической стадии заболевания [88]. Исследования, направленные на поиск молекулярных факторов, определяющих повышенную уязвимость двигательных нейронов при БАС, указывают на причастность к этому белков, вовлеченных в ответ на ЭПР-стресс [89, 90]. Более того, результаты широкомасштабного молекулярно-генетического анализа показали, что мутации в таких генах, как *PDIA1*

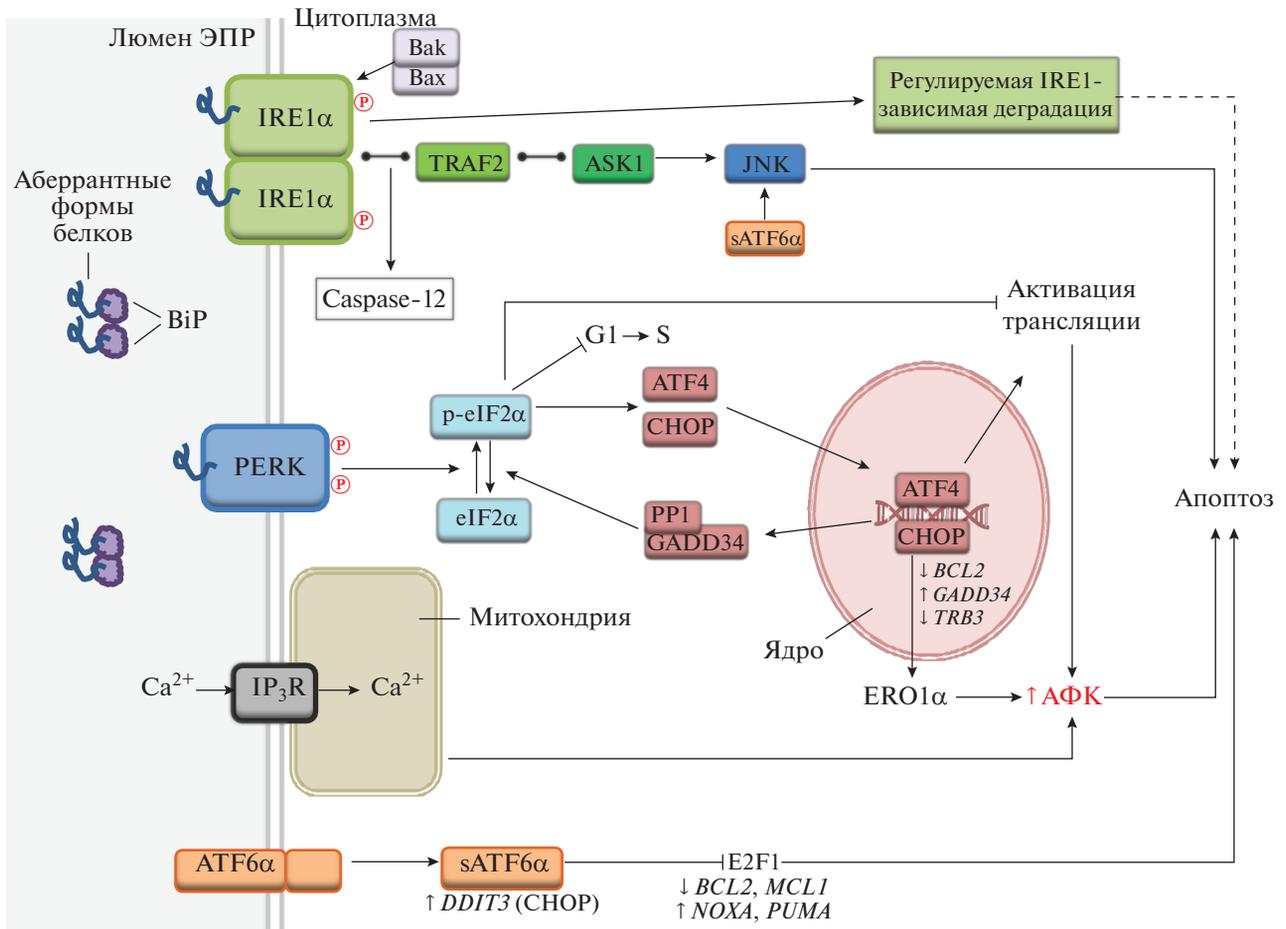


Рис. 2. Ответ на несвернутые белки регулирует выживаемость клеток. BiP – иммуноглобулинсвязывающий белок; IRE1 α – инозитолзависимая трансмембранная киназа/эндонуклеаза 1 α ; PERK – PKR-подобная ЭПР-киназа; IP₃R – рецептор инозитолтрифосфата; ATF6 α – активирующий транскрипционный фактор 6 α ; sATF6 – короткая форма ATF6 α ; Bak – антагонист Bcl-2; Bax – Bcl-2-подобный белок, ассоциированный с X-хромосомой; TRAF2 – фактор-2, ассоциированный с рецептором TNF α ; ASK1 – регулируемая апоптозом киназа-1; JNK – c-Jun N-концевая киназа; eIF2 α – эукариотический фактор инициации трансляции 2 α ; p-eIF2 α – фосфорилированная форма eIF2 α ; ATF4 – активирующий транскрипционный фактор 4; CHOP – белок-гомолог ССАТ/энхансерсвязывающего белка; PP1 – протеинфосфатаза-1; GADD34 – белок, индуцируемый остановкой роста и повреждением ДНК; BCL2 – ген белка-регулятора апоптоза семейства Bcl-2; TRB3 – ген псевдокиназы трибблис 3; ERO1 α – оксидоредуктаза-1 α ЭПР; MCL1 – ген антиапоптоического белка семейства Bcl-2; NOXA – ген проапоптоического белка семейства Bcl-2; PUMA – ген проапоптоического белка семейства Bcl-2; АФК – активные формы кислорода. Стрелкой указано стимулирующее действие, перпендикулярной линией – ингибирующее, пунктиром – предполагаемое влияние.

и PDIA3 (protein disulfide isomerase), непосредственно вовлеченных в систему поддержания белкового гомеостаза, ассоциированы с БАС [91, 92].

Все эти данные, полученные различными методами в разных лабораториях, послужили основанием для выделения молекулярного каскада ЭПР-стресса в качестве важной мишени в стратегии разработки патогенетической терапии НДЗ [18, 93–95]. А изменение показателей функционального и патогенного состояния ЭПР-стресса может быть использовано для создания методов диагностики и анализа прогрессии нейродегенеративного процесса. Именно поэтому определение содержания маркеров ЭПР-стресса, в частности уровней ATF6, ERp57 и PDI в крови и

спинномозговой жидкости, предлагается в настоящее время в качестве одного из подходов для отслеживания развития заболевания [87, 88, 96].

Модуляцию сигнальных путей ОНБ рассматривают в качестве одного из подходов для терапии НДЗ. Логично предположить, что активация ОНБ, вызванная патологической агрегацией белков при НДЗ, приводит в конечном счете к гибели пораженных нейронов и тем самым способствует прогрессии нейродегенерации. Однако в исследованиях по воздействию на ключевые звенья ОНБ выявили очень сложную систему регулирования белкового гомеостаза, определяющую конечную судьбу клетки. Простое неспецифическое стимулирование сигнальных путей ОНБ

приводило как к усилению, так и подавлению развития нейродегенеративного процесса, причем в различных экспериментах воздействие на одни и те же мишени имели разнонаправленный характер [18, 28, 97]. Например, показано, что активация PERK-опосредованного звена ОНБ может замедлять развитие заболевания в мышечных моделях таких патологий, как БАС, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, травма спинного мозга и другие. В то же время нарушение работы PERK-пути, наоборот, ускоряло развитие заболевания [18, 83, 98–106]. В противоположность этому J. Merope с соавт. [107], исследуя возможность стимулирования PERK-сигнального пути для лечения прионной болезни, сообщили о негативном действии такой стимуляции на течение заболевания у модельных животных [107]. Тогда как в работах других авторов продемонстрировано, что ингибирование PERK-пути оказывает нейропротекторный эффект у мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера [108], прионную болезнь [107, 109], и не влияет на агрегацию гентингина в модели хореи Гентингтона [110]. В перечисленных работах в качестве стимуляторов PERK-опосредованного пути использовали такие подходы, как применение ингибитора дефосфорилирования p-eIF2 α салюбринала, генетические модели нокаута гена *PPP1R15A*, кодирующего GADD34. Тогда как для ингибирования этого пути использовали нокаут генов, кодирующих PERK (*EIF2AK3*) и ATF4 (*ATF4*), или же с помощью лентивирусных векторов осуществляли доставку и экспрессию гена *GADD34*. В экспериментальных моделях конститутивное исключение генетическим нокаутом проапоптотического белка СНОР оказывало нейропротекторный эффект на моделях болезни Паркинсона, травмы спинного мозга, дегенерации глазного нерва, болезни Шарко–Мари–Тута [111–115] и, наоборот, усиливало апоптоз и патологию, вызванную мутацией в протеолипидном белке-1 (модель болезни Пелицеуса–Мерцбахера), при которой наблюдается активация ОНБ в олигодендроцитах и, как следствие, гипомиелинизация в центральной нервной системе [62].

Ряд исследований посвящен роли IRE1-опосредованного пути в патогенезе НДЗ. В частности, на токсической мышечной модели болезни Паркинсона показано, что трансдукция аденовирусным конструктором, кодирующим ХВР1s – эффектор IRE1-пути, – оказывает положительный терапевтический эффект на течение заболевания [116]. Аналогичный подход – с использованием аденоассоциированного вирусного вектора, кодирующего ХВР1s, – также дал положительный результат на моделях хореи Гентингтона [117], травмы спинного мозга [101] и при дегенерации глазного нерва [114].

В другой серии исследований изучали влияние потери функции ХВР-1 на течение нейродегене-

ративного процесса на различных животных моделях. Прижизненный кондиционный нокаут гена, кодирующего ХВР-1, значительно замедлял развитие нейродегенерации на *SOD1*^{G86R} модели БАС, при этом наблюдалось усиление аутофагии [118]. Сходный эффект описан и для модели болезни Гентингтона [110]. В то же время кондиционный нокаут *Xbp1* отрицательно сказывался на восстановлении мышей после экспериментальной травмы спинного мозга [101], не давал эффекта на модели инфекционной прионной болезни [119], а также не влиял на выживаемость ганглионарных клеток сетчатки при дегенерации глазного нерва [114]. На примере модели болезни Гентингтона видно, что как усиление, так и нарушение функции ХВР-1 может приводить к одному и тому же эффекту – замедлению процесса нейродегенерации. Безусловно, для объяснения этого феномена, а также его уточнения необходимы дополнительные исследования.

Намного меньше известно об эффектах, индуцируемых при воздействии на ATF6-ветвь ОНБ при нейродегенерации. Конститутивный нокаут гена *ATF6* усиливал развитие патологии на токсической модели болезни Паркинсона [120, 121], что косвенно свидетельствует о его роли в качестве протектора. Более того, активация ATF6 через блокирование его взаимодействия с Са-связывающим белком DREAM (downstream regulatory element antagonist modulator) замедляла развитие нейродегенерации на модели хореи Гентингтона [122, 123]. Стоит также отметить, что стимуляция сигнала от ATF6 также оказывала нейропротекторный эффект на модели ишемического инсульта [124].

Приведенные результаты показывают, что вклад ОНБ в развитие НДЗ неоднозначный и представляет собой сложную взаимосвязанную цепь разнонаправленных метаболических путей, а итоговый результат терапевтического вмешательства в программу реализации стрессового ответа, вероятно, зависит от типа патологии и, возможно, от времени воздействия относительно стадии патологического процесса. Так, на трансгенной мышечной модели БАС (*SOD1*^{G93A}) показано, что салюбринал (повышает уровень p-eIF2 α) увеличивает продолжительность жизни животных [98]. В то же время у мышей, нокаутных по гену *Atf4* и содержащих трансген с мутантным *SOD1* (*atf4*^{-/-}/*SOD1*^{G85R}), зарегистрирована частичная эмбриональная летальность и в то же время увеличение продолжительности жизни родившихся животных [100]. Интересно, что ATF4 и p-eIF2 α принадлежат к одной сигнальной ветви ОНБ, активируемой PERK, причем в этом каскаде ATF4 располагается ниже p-eIF2 α . Другое соединение, способное повышать уровень p-eIF2 α за счет ингибирования GADD34, – гуанобенц – тоже протестировано на мышцах линии *SOD1*^{G93A} и

дало положительный результат, увеличив продолжительность жизни трансгенных мышей и ослабив развитие патологии [125]. Однако в последующих исследованиях выявлен противоположный эффект — усиление прогрессии заболевания [126]. В качестве возможной причины этих противоречий может быть введение животным гуанабенца на более продвинутой фазе заболевания в последнем исследовании — что и привело к усилению проапоптотического пути ОНБ; кроме того, нельзя исключить побочного действия, вызванного введенным препаратом [126].

Таким образом, требуются дальнейшие детальные исследования роли ОНБ в патогенезе НДЗ с целью выявить вклад различных сигнальных путей в развитие конкретной патологии. Неясными остаются многие вопросы. На какой стадии развития патологического процесса и какие факторы определяют момент переключения программы развертывания ОНБ с проадаптивной на проапоптотическую; какое место занимает ЭПР-стресс в механизмах нейродегенерации — это вторичный процесс, сопровождающий развитие патологии, или он вовлечен в инициацию и патогенез заболевания. Множество данных подтверждает скорее последнюю гипотезу. Так, показано, что инъекции активатора ЭПР-стресса туникамицина в черную субстанцию вызывают у крыс олигомеризацию α -синуклеина и формирование фенотипа, характерного для болезни Паркинсона [127]. Также ЭПР-стресс, по-видимому, принимает участие в распространении патологического процесса в мозге: инъекция пептидов А β 1–42 в зубчатую извилину мышей индуцировала гибель холинэргических нейронов в базальных ядрах, которые имеют проекции в зубчатую извилину, а распространение повреждения связывали с передачей сигнала об ЭПР-стрессе через локальный аксональный синтез ATF4 и его ретроградный транспорт [79]. Известно, что при прогрессировании ряда нейродегенеративных заболеваний в патологический процесс вовлекаются все новые и новые участки мозга и с таким распространением патологии связывают различные стадии болезни [128–133]. В связи с этим актуален вопрос о возможности купирования процесса распространения патологической агрегации белков на ранней стадии заболевания путем локального ингибирования ответа на несвернутые белки.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-25-00645).

Работа не содержит экспериментов с использованием животных или с участием человека.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balch W.E., Morimoto R.I., Dillin A., Kelly J.W. (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*. **319**, 916–919.
2. Hipp M.S., Kasturi P., Hartl F.U. (2019) The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 421–435.
3. Dubnikov T., Ben-Gedalya T., Cohen E. (2017) Protein quality control in health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a023523.
4. Uversky V.N., Finkelstein A.V. (2019) Life in phases: intra- and inter-molecular phase transitions in protein solutions. *Biomolecules*. **9**, 842.
5. Bardwell J.C., Jakob U. (2012) Conditional disorder in chaperone action. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 517–525.
6. Fuxreiter M., Toth-Petroczy A., Kraut D.A., Matusek A., Lim R.Y., Xue B., Kurgan L., Uversky V.N. (2014) Disordered proteinaceous machines. *Chem. Rev.* **114**, 6806–6843.
7. Leidhold C., Voos W. (2007) Chaperones and proteases—guardians of protein integrity in eukaryotic organisms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1113**, 72–86.
8. Kampinga H.H., Mayer M.P., Mogk A. (2019) Protein quality control: from mechanism to disease. *Cell Stress Chaperones*. **24**, 1013–1026.
9. Hetz C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 89–102.
10. Lin J.H., Walter P., Yen T.S. (2008) Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* **3**, 399–425.
11. Дедов И.И., Смирнова О.М., Горельшев А.С. (2012) Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека. *Проблемы эндокринологии*. **58**, 57–65.
12. Зверев Я.Ф., Брюханов В.М. (2012) Стресс эндоплазматического ретикулума глазами нефролога (сообщение 1). *Нефрология*. **16**(3/1), 54–71. <https://doi.org/10.24884/1561-6274-2012-16-3/1-54-71>
13. Mesitov M.V., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A. (2013) Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of unfolded protein response. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* **4**, 97–108 (in Russ.).
14. Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Петерс О., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. (2012) Протеинопатии — формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков. *Молекуляр. биология*. **46**, 402–415.
15. Bhattarai K.R., Chaudhary M., Kim H.R., Chae H.J. (2020) Endoplasmic reticulum (ER) stress response failure in diseases. *Trends Cell Biol.* **30**, 672–675.
16. Lindholm D., Korhonen L., Eriksson O., Koks S. (2017) Recent insights into the role of unfolded protein response in ER stress in health and disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **5**, 48.
17. Wang M., Kaufman R.J. (2016) Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*. **529**, 326–335.

18. Hetz C., Mollereau B. (2014) Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 233–249.
19. Rutkowski D.T., Arnold S.M., Miller C.N., Wu J., Li J., Gunnison K.M., Mori K., Sadighi Akha A.A., Raden D., Kaufman R.J. (2006) Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* **4**, e374.
20. Lin J.H., Li H., Yasumura D., Cohen H.R., Zhang C., Panning B., Shokat K.M., Lavail M.M., Walter P. (2007) IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*. **318**, 944–949.
21. Marciniak S.J., Yun C.Y., Oyadomari S., Novoa I., Zhang Y., Jungreis R., Nagata K., Harding H.P., Ron D. (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **18**, 3066–3077.
22. Szegezdi E., Logue S.E., Gorman A.M., Samali A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* **7**, 880–885.
23. Sano R., Reed J.C. (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**, 3460–3470.
24. Urra H., Dufey E., Lisbona F., Rojas-Rivera D., Hetz C. (2013) When ER stress reaches a dead end. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**, 3507–3517.
25. Wang P., Li J., Tao J., Sha B. (2018) The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization. *J. Biol. Chem.* **293**, 4110–4121.
26. Chen X., Shen J., Prywes R. (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J. Biol. Chem.* **277**, 13045–13052.
27. Liu Z., Lv Y., Zhao N., Guan G., Wang J. (2015) Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death Dis.* **6**, e1822.
28. Rozpedek W., Nowak A., Pytel D., Diehl J.A., Majsterek I. (2017) Molecular basis of human diseases and targeted therapy based on small-molecule inhibitors of ER stress-induced signaling pathways. *Curr. Mol. Med.* **17**, 118–132.
29. Walter P., Ron D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. **334**, 1081–1086.
30. Ron D., Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519–529.
31. Zhang K., Wong H.N., Song B., Miller C.N., Scheuner D., Kaufman R.J. (2005) The unfolded protein response sensor IRE1 α is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J. Clin. Invest.* **115**, 268–281.
32. Reimold A.M., Etkin A., Clauss I., Perkins A., Friend D.S., Zhang J., Horton H.F., Scott A., Orkin S.H., Byrne M.C., Grusby M.J., Glimcher L.H. (2000) An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev.* **14**, 152–157.
33. Harding H.P., Zeng H., Zhang Y., Jungreis R., Chung P., Plesken H., Sabatini D.D., Ron D. (2001) Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *Perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell.* **7**, 1153–1163.
34. Zhang P., McGrath B., Li S., Frank A., Zambito F., Reinert J., Gannon M., Ma K., McNaughton K., Cavener D.R. (2002) The PERK eukaryotic initiation factor 2 α -kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol. Cell Biol.* **22**, 3864–3874.
35. Scheuner D., Song B., McEwen E., Liu C., Laybutt R., Gillespie P., Saunders T., Bonner-Weir S., Kaufman R.J. (2001) Translational control is required for the unfolded protein response and *in vivo* glucose homeostasis. *Mol. Cell.* **7**, 1165–1176.
36. Wu J., Rutkowski D.T., Dubois M., Swathirajan J., Saunders T., Wang J., Song B., Yau G.D., Kaufman R.J. (2007) ATF6 α optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev. Cell.* **13**, 351–364.
37. Yamamoto K., Sato T., Matsui T., Sato M., Okada T., Yoshida H., Harada A., Mori K. (2007) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP-1. *Dev. Cell.* **13**, 365–376.
38. Zhou J., Liu C.Y., Back S.H., Clark R.L., Peisach D., Xu Z., Kaufman R.J. (2006) The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 14343–14348.
39. Cui W., Li J., Ron D., Sha B. (2011) The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **67**, 423–428.
40. Walker A.K., Soo K.Y., Sundaramoorthy V., Parakh S., Ma Y., Farg M.A., Wallace R.H., Crouch P.J., Turner B.J., Horne M.K., Atkin J.D. (2013) ALS-associated TDP-43 induces endoplasmic reticulum stress, which drives cytoplasmic TDP-43 accumulation and stress granule formation. *PLoS One.* **8**, e81170.
41. Buchan J.R. (2014) mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol.* **11**, 1019–1030.
42. Protter D.S.W., Parker R. (2016) Principles and properties of stress granules. *Trends Cell. Biol.* **26**, 668–679.
43. Kedersha N.L., Gupta M., Li W., Miller I., Anderson P. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* **147**, 1431–1442.
44. Buchan J.R., Parker R. (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell.* **36**, 932–941.
45. Andreev D.E., O'Connor P.B., Fahey C., Kenny E.M., Terenin I.M., Dmitriev S.E., Cormican P., Morris D.W., Shatsky I.N., Baranov P.V. (2015) Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression. *eLife.* **4**, e03971.
46. Young S.K., Willy J.A., Wu C., Sachs M.S., Wek R.C. (2015) Ribosome reinitiation directs gene-specific translation and regulates the integrated stress response. *J. Biol. Chem.* **290**, 28257–28271.

47. Han J., Back S.H., Hur J., Lin Y.H., Gildersleeve R., Shan J., Yuan C.L., Krokowski D., Wang S., Hatzoglou M., Kilberg M.S., Sartor M.A., Kaufman R.J. (2013) ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat. Cell Biol.* **15**, 481–490.
48. Harding H.P., Zhang Y., Scheuner D., Chen J.J., Kaufman R.J., Ron D. (2009) *Ppp1r15* gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 α (eIF2 α) dephosphorylation in mammalian development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 1832–1837.
49. Pakos-Zebrucka K., Koryga I., Mnich K., Ljubic M., Samali A., Gorman A.M. (2016) The integrated stress response. *EMBO Rep.* **17**, 1374–1395.
50. Costa-Mattioli M., Walter P. (2020) The integrated stress response: from mechanism to disease. *Science.* **368**, eaat5314.
51. Hollien J., Weissman J.S. (2006) Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science.* **313**, 104–107.
52. Haze K., Yoshida H., Yanagi H., Yura T., Mori K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 3787–3799.
53. Okada T., Yoshida H., Akazawa R., Negishi M., Mori K. (2002) Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* **366**, 585–594.
54. Breckenridge D.G., Germain M., Mathai J.P., Nguyen M., Shore G.C. (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene.* **22**, 8608–8618.
55. Xu C., Bailly-Maitre B., Reed J.C. (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* **115**, 2656–2664.
56. Iurlaro R., Munoz-Pinedo C. (2016) Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J.* **283**, 2640–2652.
57. Hu H., Tian M., Ding C., Yu S. (2018) The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front. Immunol.* **9**, 3083.
58. Kojima E., Takeuchi A., Haneda M., Yagi A., Hasegawa T., Yamaki K., Takeda K., Akira S., Shimokata K., Isobe K. (2003) The function of GADD34 is a recovery from a shutoff of protein synthesis induced by ER stress: elucidation by GADD34-deficient mice. *FASEB J.* **17**, 1573–1575.
59. Song B., Scheuner D., Ron D., Pennathur S., Kaufman R.J. (2008) Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J. Clin. Invest.* **118**, 3378–3389.
60. Malhotra J.D., Miao H., Zhang K., Wolfson A., Pennathur S., Pipe S.W., Kaufman R.J. (2008) Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 18525–18530.
61. Chen C.M., Wu C.T., Chiang C.K., Liao B.W., Liu S.H. (2012) C/EBP homologous protein (CHOP) deficiency aggravates hippocampal cell apoptosis and impairs memory performance. *PLoS One.* **7**, e40801.
62. Southwood C.M., Garbern J., Jiang W., Gow A. (2002) The unfolded protein response modulates disease severity in Pelizaeus–Merzbacher disease. *Neuron.* **36**, 585–596.
63. Yang L., Li S., Miao L., Huang H., Liang F., Teng X., Xu L., Wang Q., Xiao W., Ridder W.H., 3rd, Ferguson T.A., Chen D.F., Kaufman R.J., Hu Y. (2016) Rescue of glaucomatous neurodegeneration by differentially modulating neuronal endoplasmic reticulum stress molecules. *J. Neurosci.* **36**, 5891–5903.
64. Rao J., Zhang C., Wang P., Lu L., Qian X., Qin J., Pan X., Li G., Wang X., Zhang F. (2015) C/EBP homologous protein (CHOP) contributes to hepatocyte death via the promotion of ERO1 α signalling in acute liver failure. *Biochem. J.* **466**, 369–378.
65. Li G., Mongillo M., Chin K.T., Harding H., Ron D., Marks A.R., Tabas I. (2009) Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* **186**, 783–792.
66. Kaufman R.J., Malhotra J.D. (2014) Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1843**, 2233–2239.
67. Urano F., Wang X., Bertolotti A., Zhang Y., Chung P., Harding H.P., Ron D. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* **287**, 664–666.
68. Luo D., He Y., Zhang H., Yu L., Chen H., Xu Z., Tang S., Urano F., Min W. (2008) AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* **283**, 11905–11912.
69. Tabas I., Ron D. (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* **13**, 184–190.
70. Yoneda T., Imaizumi K., Oono K., Yui D., Gomi F., Katayama T., Tohyama M. (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* **276**, 13935–13940.
71. Hetz C., Glimcher L.H. (2009) Fine-tuning of the unfolded protein response: assembling the IRE1 α interactome. *Mol. Cell.* **35**, 551–561.
72. Nakanishi K., Sudo T., Morishima N. (2005) Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *J. Cell Biol.* **169**, 555–560.
73. Morishima N., Nakanishi K., Nakano A. (2011) Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein 1. *J. Biol. Chem.* **286**, 35227–35235.
74. Yang Y., Sun M., Shan Y., Zheng X., Ma H., Ma W., Wang Z., Pei X., Wang Y. (2015) Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptotic pathway is involved in corpus luteum regression in rats. *Reprod. Sci.* **22**, 572–584.

75. Park H.J., Park S.J., Koo D.B., Kong I.K., Kim M.K., Kim J.M., Choi M.S., Park Y.H., Kim S.U., Chang K.T., Park C.K., Chae J.I., Lee D.S. (2013) Unfolding protein response signaling is involved in development, maintenance, and regression of the corpus luteum during the bovine estrous cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441**, 344–350.
76. Hillary R.F., FitzGerald U. (2018) A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *J. Biomed. Sci.* **25**, 48.
77. Huang J., Wan L., Lu H., Li X. (2018) High expression of active ATF6 aggravates endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial cell apoptosis through the mitochondrial apoptotic pathway. *Mol. Med. Rep.* **17**, 6483–6489.
78. Pagliarini V., Giglio P., Bernardoni P., De Zio D., Fimia G.M., Piacentini M., Corazzari M. (2015) Downregulation of E2F1 during ER stress is required to induce apoptosis. *J. Cell Sci.* **128**, 1166–1179.
79. Baleriola J., Walker C.A., Jean Y.Y., Crary J.F., Troy C.M., Nagy P.L., Hengst U. (2014) Axonally synthesized ATF4 transmits a neurodegenerative signal across brain regions. *Cell.* **158**, 1159–1172.
80. Liu S.Y., Wang W., Cai Z.Y., Yao L.F., Chen Z.W., Wang C.Y., Zhao B., Li K.S. (2013) Polymorphism –116C/G of human X-box-binding protein 1 promoter is associated with risk of Alzheimer’s disease. *CNS Neurosci. Ther.* **19**, 229–234.
81. Hoozemans J.J., van Haastert E.S., Eikelenboom P., de Vos R.A., Rozemuller J.M., Scheper W. (2007) Activation of the unfolded protein response in Parkinson’s disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 707–711.
82. Chung C.Y., Khurana V., Auluck P.K., Tardiff D.F., Mazzulli J.R., Soldner F., Baru V., Lou Y., Freyzon Y., Cho S., Mungenast A.E., Muffat J., Mitalipova M., Pluth M.D., Jui N.T., Schule B., Lippard S.J., Tsai L.H., Krainc D., Buchwald S.L., Jaenisch R., Lindquist S. (2013) Identification and rescue of α -synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science.* **342**, 983–987.
83. Colla E., Coune P., Liu Y., Pletnikova O., Troncoso J.C., Iwatsubo T., Schneider B.L., Lee M.K. (2012) Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of α -synucleinopathy *in vivo*. *J. Neurosci.* **32**, 3306–3320.
84. Ilieva E.V., Ayala V., Jove M., Dalfo E., Cacabelos D., Povedano M., Bellmunt M.J., Ferrer I., Pamplona R., Portero-Otin M. (2007) Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* **130**, 3111–3123.
85. Sasaki S. (2010) Endoplasmic reticulum stress in motor neurons of the spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 346–355.
86. Ito Y., Yamada M., Tanaka H., Aida K., Tsuruma K., Shimazawa M., Hozumi I., Inuzuka T., Takahashi H., Hara H. (2009) Involvement of CHOP, an ER-stress apoptotic mediator, in both human sporadic ALS and ALS model mice. *Neurobiol. Dis.* **36**, 470–476.
87. Prell T., Stubendorff B., Le T.T., Gaur N., Tadic V., Rodiger A., Witte O.W., Grosskreutz J. (2019) Reaction to endoplasmic reticulum stress via ATF6 in amyotrophic lateral sclerosis deteriorates with aging. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 5.
88. Atkin J.D., Farg M.A., Walker A.K., McLean C., Tomas D., Horne M.K. (2008) Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **30**, 400–407.
89. Ng S.Y., Soh B.S., Rodriguez-Muela N., Hendrickson D.G., Price F., Rinn J.L., Rubin L.L. (2015) Genome-wide RNA-Seq of human motor neurons implicates selective ER stress activation in spinal muscular atrophy. *Cell Stem Cell.* **17**, 569–584.
90. Rozas P., Bargsted L., Martinez F., Hetz C., Medina D.B. (2017) The ER proteostasis network in ALS: determining the differential motoneuron vulnerability. *Neurosci. Lett.* **636**, 9–15.
91. Yang Q., Guo Z.B. (2016) Polymorphisms in protein disulfide isomerase are associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis in the Chinese Han population. *Int. J. Neurosci.* **126**, 607–611.
92. Gonzalez-Perez P., Woehlbier U., Chian R.J., Sapp P., Rouleau G.A., Leblond C.S., Daoud H., Dion P.A., Landers J.E., Hetz C., Brown R.H. (2015) Identification of rare protein disulfide isomerase gene variants in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Gene.* **566**, 158–165.
93. Puri B.K., Morris G. (2018) Potential therapeutic interventions based on the role of the endoplasmic reticulum stress response in progressive neurodegenerative diseases. *Neural. Regen. Res.* **13**, 1887–1889.
94. Ghemrawi R., Khair M. (2020) Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6127.
95. Kukharsky M.S., Skvortsova V.I., Bachurin S.O., Buchman V.L. (2021) In a search for efficient treatment for amyotrophic lateral sclerosis: old drugs for new approaches. *Med. Res. Rev.* **41**, 2804–2822.
96. Nardo G., Pozzi S., Pignataro M., Lauranzano E., Spano G., Garbelli S., Mantovani S., Marinou K., Pappetti L., Monteforte M., Torri V., Paris L., Bazzoni G., Lunetta C., Corbo M., Mora G., Bendotti C., Bonetto V. (2011) Amyotrophic lateral sclerosis multiprotein biomarkers in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One.* **6**, e25545.
97. Webster C.P., Smith E.F., Shaw P.J., De Vos K.J. (2017) Protein homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: therapeutic opportunities? *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 123.
98. Saxena S., Cabuy E., Caroni P. (2009) A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nat. Neurosci.* **12**, 627–636.
99. Wang L., Popko B., Roos R.P. (2011) The unfolded protein response in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1008–1015.
100. Matus S., Lopez E., Valenzuela V., Nassif M., Hetz C. (2013) Functional contribution of the transcription factor ATF4 to the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.* **8**, e66672.
101. Valenzuela V., Collyer E., Armentano D., Parsons G.B., Court F.A., Hetz C. (2012) Activation of the unfolded

- protein response enhances motor recovery after spinal cord injury. *Cell Death Dis.* **3**, e272.
102. Ohri S.S., Hetman M., Whittemore S.R. (2013) Restoring endoplasmic reticulum homeostasis improves functional recovery after spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.* **58**, 29–37.
 103. Lin W., Kemper A., Dupree J.L., Harding H.P., Ron D., Popko B. (2006) Interferon- γ inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress. *Brain.* **129**, 1306–1318.
 104. Lin W., Kunkler P.E., Harding H.P., Ron D., Kraig R.P., Popko B. (2008) Enhanced integrated stress response promotes myelinating oligodendrocyte survival in response to interferon- γ . *Am. J. Pathol.* **173**, 1508–1517.
 105. Lin W., Bailey S.L., Ho H., Harding H.P., Ron D., Miller S.D., Popko B. (2007) The integrated stress response prevents demyelination by protecting oligodendrocytes against immune-mediated damage. *J. Clin. Invest.* **117**, 448–456.
 106. Lin W., Lin Y., Li J., Fenstermaker A.G., Way S.W., Clayton B., Jamison S., Harding H.P., Ron D., Popko B. (2013) Oligodendrocyte-specific activation of PERK signaling protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci.* **33**, 5980–5991.
 107. Moreno J.A., Radford H., Peretti D., Steinert J.R., Verity N., Martin M.G., Halliday M., Morgan J., Dinsdale D., Ortori C.A., Barrett D.A., Tsaytler P., Bertolotti A., Willis A.E., Bushell M., Mallucci G.R. (2012) Sustained translational repression by eIF2 α -P mediates prion neurodegeneration. *Nature.* **485**, 507–511.
 108. Ma T., Trinh M.A., Wexler A.J., Bourbon C., Gatti E., Pierre P., Cavener D.R., Klann E. (2013) Suppression of eIF2 α kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat. Neurosci.* **16**, 1299–1305.
 109. Moreno J.A., Halliday M., Molloy C., Radford H., Verity N., Axten J.M., Ortori C.A., Willis A.E., Fischer P.M., Barrett D.A., Mallucci G.R. (2013) Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice. *Sci. Transl. Med.* **5**, 206ra138.
 110. Vidal R.L., Figueroa A., Court F.A., Thielen P., Molina C., Wirth C., Caballero B., Kiffin R., Segura-Aguilar J., Cuervo A.M., Glimcher L.H., Hetz C. (2012) Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2245–2262.
 111. Silva R.M., Ries V., Oo T.F., Yarygina O., Jackson-Lewis V., Ryu E.J., Lu P.D., Marciniak S.J., Ron D., Przedborski S., Kholodilov N., Greene L.A., Burke R.E. (2005) CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an *in vivo* neurotoxin model of parkinsonism. *J. Neurochem.* **95**, 974–986.
 112. Wang Z., Zhang C., Hong Z., Chen H., Chen W., Chen G. (2013) C/EBP homologous protein (CHOP) mediates neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury. *Exp. Ther. Med.* **5**, 107–111.
 113. Ohri S.S., Maddie M.A., Zhao Y., Qiu M.S., Hetman M., Whittemore S.R. (2011) Attenuating the endoplasmic reticulum stress response improves functional recovery after spinal cord injury. *Glia.* **59**, 1489–1502.
 114. Hu Y., Park K.K., Yang L., Wei X., Yang Q., Cho K.S., Thielen P., Lee A.H., Cartoni R., Glimcher L.H., Chen D.F., He Z. (2012) Differential effects of unfolded protein response pathways on axon injury-induced death of retinal ganglion cells. *Neuron.* **73**, 445–452.
 115. Pennuto M., Tinelli E., Malaguti M., Del Carro U., D'Antonio M., Ron D., Quattrini A., Feltri M.L., Wrabetz L. (2008) Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice. *Neuron.* **57**, 393–405.
 116. Sado M., Yamasaki Y., Iwanaga T., Onaka Y., Ibuki T., Nishihara S., Mizuguchi H., Momota H., Kishibuchi R., Hashimoto T., Wada D., Kitagawa H., Watanabe T.K. (2009) Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1. *Brain Res.* **1257**, 16–24.
 117. Zuleta A., Vidal R.L., Armentano D., Parsons G., Hetz C. (2012) AAV-mediated delivery of the transcription factor XBP1s into the striatum reduces mutant Huntingtin aggregation in a mouse model of Huntington's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **420**, 558–563.
 118. Hetz C., Thielen P., Matus S., Nassif M., Court F., Kiffin R., Martinez G., Cuervo A.M., Brown R.H., Glimcher L.H. (2009) XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* **23**, 2294–2306.
 119. Hetz C., Lee A.H., Gonzalez-Romero D., Thielen P., Castilla J., Soto C., Glimcher L.H. (2008) Unfolded protein response transcription factor XBP-1 does not influence prion replication or pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 757–762.
 120. Hashida K., Kitao Y., Sudo H., Awa Y., Maeda S., Mori K., Takahashi R., Iinuma M., Hori O. (2012) ATF6 α promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One.* **7**, e47950.
 121. Egawa N., Yamamoto K., Inoue H., Hikawa R., Nishi K., Mori K., Takahashi R. (2011) The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 α , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J. Biol. Chem.* **286**, 7947–7957.
 122. Naranjo J.R., Zhang H., Villar D., Gonzalez P., Dopazo X.M., Moron-Oset J., Higuera E., Oliveros J.C., Arrabal M.D., Prieto A., Cercos P., Gonzalez T., De la Cruz A., Casado-Vela J., Rabano A., Valenzuela C., Gutierrez-Rodriguez M., Li J.Y., Mellstrom B. (2016) Activating transcription factor 6 derepression mediates neuroprotection in Huntington disease. *J. Clin. Invest.* **126**, 627–638.
 123. Lopez-Hurtado A., Burgos D.F., Gonzalez P., Dopazo X.M., Gonzalez V., Rabano A., Mellstrom B., Naranjo J.R. (2018) Inhibition of DREAM-ATF6 interaction delays onset of cognition deficit in a mouse model of Huntington's disease. *Mol. Brain.* **11**, 13.
 124. Yu Z., Sheng H., Liu S., Zhao S., Glembotski C.C., Warner D.S., Paschen W., Yang W. (2017) Activation

- of the ATF6 branch of the unfolded protein response in neurons improves stroke outcome. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 1069–1079.
125. Jiang H.Q., Ren M., Jiang H.Z., Wang J., Zhang J., Yin X., Wang S.Y., Qi Y., Wang X.D., Feng H.L. (2014) Guanabenz delays the onset of disease symptoms, extends lifespan, improves motor performance and attenuates motor neuron loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience.* **277**, 132–138.
126. Vieira F.G., Ping Q., Moreno A.J., Kidd J.D., Thompson K., Jiang B., Lincecum J.M., Wang M.Z., De Zutter G.S., Tassinari V.R., Levine B., Hatzipetros T., Gill A., Perrin S. (2015) Guanabenz treatment accelerates disease in a mutant SOD1 mouse model of ALS. *PLoS One.* **10**, e0135570.
127. Coppola-Segovia V., Cavarsan C., Maia F.G., Ferraz A.C., Nakao L.S., Lima M.M., Zanata S.M. (2016) ER stress induced by tunicamycin triggers α -synuclein oligomerization, dopaminergic neurons death and locomotor impairment: a new model of Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.* **54**, 5798–5806.
128. Braak H., Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82**, 239–259.
129. Brettschneider J., Del Tredici K., Lee V.M., Trojanowski J.Q. (2015) Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 109–120.
130. Vogel J.W., Iturria-Medina Y., Strandberg O.T., Smith R., Levitis E., Evans A.C., Hansson O., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative; Swedish BioFinder Study (2020) Spread of pathological tau proteins through communicating neurons in human Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* **11**, 2612.
131. Henderson M.X., Cornblath E.J., Darwich A., Zhang B., Brown H., Gathagan R.J., Sandler R.M., Bassett D.S., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. (2019) Spread of α -synuclein pathology through the brain connectome is modulated by selective vulnerability and predicted by network analysis. *Nat. Neurosci.* **22**, 1248–1257.
132. Jucker M., Walker L.C. (2013) Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature.* **501**, 45–51.
133. Martinez G., Duran-Aniotz C., Cabral-Miranda F., Vivar J.P., Hetz C. (2017) Endoplasmic reticulum proteostasis impairment in aging. *Aging Cell.* **16**, 615–623.

PROTEIN HOMEOSTASIS DYSREGULATION IN PATHOGENESIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

M. S. Kukharsky^{1, 2, *}, M. W. Everett¹, O. A. Lytkina², M. A. Raspopova², E. A. Kovrazhkina³, R. K. Ovchinnikov^{1, 2}, A. I. Antohin¹, and A. A. Moskovtsev^{1, 4}

¹Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

²Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

³Federal Centre for Brain and Neurotechnologies, Federal Medical and Biological Agency, Moscow, 117997 Russia

⁴Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia

*e-mail: kukharskym@gmail.com

The formation and accumulation of unfolded, misfolded, or damaged cellular proteins leads to development of endoplasmic reticulum stress (ER stress). A series of protective reactions is initiated in response to ER stress. These reactions are aimed at restoring the balance between protein synthesis and degradation, which is key to maintaining protein homeostasis (proteostasis). The main protective mechanisms are the attenuation of protein synthesis, increase of chaperone levels, and activation of protein degradation systems. Insufficiency or malfunction of these mechanisms induce apoptosis. Proteostasis dysregulation accompanied by protein aggregation and subsequent cell death in specific regions of the nervous system is a common pathogenetic hallmark of most neurodegenerative diseases. We discuss targeted regulation of the ER stress signaling pathways as a potential therapeutic strategy that can slow or even halt the disease progression.

Keywords: ER stress, protein aggregation, proteostasis, neurodegenerative diseases

УДК 577.29

СУПРЕССОР ОПУХОЛЕЙ p53 И МЕТАБОЛИЗМ МЕДИ: МАЛОИЗВЕСТНАЯ, НО ВАЖНАЯ СВЯЗЬ

© 2022 г. С. А. Цымбал^а, *., #, А. Г. Рефельд^а, #, О. А. Кучур^а^а Химико-биологический кластер, Университет информационных технологий механики и оптики (ИТМО), Санкт-Петербург, 197101 Россия

*e-mail: zimbalscamt-itmo.ru

Поступила в редакцию 01.04.2022 г.

После доработки 03.06.2022 г.

Принята к публикации 28.06.2022 г.

Баланс окислительно-восстановительных реакций и судьба опухолевой клетки тесно связаны с регуляцией внутриклеточного гомеостаза переходных металлов, среди которых исключительно важную роль играют медь и ее соединения. Повышенный внутриклеточный уровень ионов меди может быть причиной или следствием малигнизации, так как метаболизм этого металла влияет на функционирование цепи переноса электронов, регуляцию транскрипции, рост и миграцию клеток. Такие воздействия, как генерация активных форм кислорода (АФК) и апоптоз, опосредованные добавлением препаратов на основе меди, депривация ионов меди хелаторами и таргетное ингибирование конкретных участников цепи метаболизма меди, эффективно снижают выживаемость опухолевых клеток и используются в противоопухолевой терапии. Однако точные механизмы влияния на клеточный цикл и клеточную гибель, стоящие за активностью медь-ассоциированных препаратов, до сих пор практически не изучены. Многочисленные попытки идентифицировать эти механизмы приводят к выявлению индукции окислительного стресса и активации апоптотических каскадов, основным элементом в регуляции которых является опухолевый супрессор p53. При этом влияние этого белка, опосредующего процессы антиоксидантной защиты и выживания, распространяется, по всей видимости, и на активность белков метаболизма меди. Все больше исследований подтверждает, что взаимодействие медьсодержащих соединений и белков метаболизма меди с фактором p53 многогранно и не замыкается исключительно на АФК. В нашем обзоре рассмотрена связь транскрипционного фактора p53 с метаболическими путями, регулирующими распределение меди, и возможность использования этой взаимосвязи для повышения эффективности онкотерапии.

Ключевые слова: метаболизм меди, активные формы кислорода, p53, химиотерапия, медные металлошапероны, Atox1, Ctrl1, терапия опухолей

DOI: 10.31857/S0026898422060222

ВВЕДЕНИЕ

В опухолевых тканях повышена концентрация меди как в виде свободных ионов, так и в связанном с белками состоянии [1, 2]. Этот факт не удивителен, учитывая влияние меди на функционирование митохондрий, процессы клеточного роста, пролиферации, миграции и окислительно-восстановительного баланса [3]. Кроме того, новые исследования выявляют корреляцию между концентрацией ионов меди и активностью таких сигнальных каскадов, ассоциированных с малигнизацией, как B-Raf, Akt, HIF1 и др. [4]. Становится очевидным, что функции меди в клетке не сводятся исключительно к функциям медьсодержащих белков, ее роль в опухолевых процессах гораздо существеннее, чем считалось ранее.

Принимая это во внимание, можно рассчитывать на высокую противоопухолевую эффективность препаратов, терапевтическая активность которых обусловлена влиянием на внутриклеточный уровень меди. И действительно, существует несколько классов веществ такого рода, все они находятся на разных стадиях испытаний [5]. Общим их свойством является многоплановое воздействие на клетку, которое зачастую реализуется через генерацию АФК и приводит в итоге к индукции апоптоза. Во многих случаях апоптоз происходит через активацию p53, причем, как ни парадоксально, и при депривации меди, и при использовании цитотоксинов на ее основе. Основные функции p53 – регуляция процессов клеточной гибели, контроль клеточного цикла и процессов репарации – изучены достаточно давно и детально [6, 7]. Кроме того, p53 известен индукцией перестроек в энергетическом метаболизме [8, 9]. Подобные

Эти авторы внесли равный вклад в работу.

эффекты описаны в последние десятилетия и для медьзависимых внутриклеточных белков (SCO2, Atox1) [10–12]. В конце концов, и медь, и p53 принимают участие в регуляции окислительно-восстановительного баланса [13, 14]. В нашем обзоре обобщены имеющиеся на настоящий момент данные о взаимосвязи между активностью p53 и метаболизмом меди, а также кратко рассмотрено возможное их применение в разработке стратегий лечения опухолей.

МЕТАБОЛИЗМ МЕДИ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Опухолевые клетки претерпевают значительные перестройки метаболизма, направленные на поддержание пластичности (выживаемость, пролиферативный потенциал, способность к метастазированию), и требуют существенного биохимического регулирования [15, 16]. Метаболизм меди не исключение: жизненно важная роль этого металла в ключевых клеточных процессах (деления и дыхания клеток, защите от АФК, ангиогенезе) создает увеличенную потребность опухолевых клеток в меди [17], что закономерно приводит к повышению концентрации меди в опухоли в сравнении со здоровыми тканями [18]. В первую очередь ионы меди способствуют ангиогенезу, стимулируя продукцию факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) и фибробластов (FGF) [19–21]. Этот металл может также частично регулировать транскрипционную активность фактора HIF1 [22–24]. В то же время медь не только влияет на ангиогенез, она усиливает активность сигнальных путей B-Raf [25], Akt [26], RTK [27], JNK [28], ULK1 и ULK2 [29], которые связаны с контролем пролиферативной активности и выживаемости опухолевых клеток. Существенно влияние меди и на процессы метастазирования, так как она служит кофактором лизилоксидазы (LOX), которая участвует в процессах перестройки внеклеточного матрикса за счет создания “сшивков” в молекулах коллагена и эластина. Тем самым медь способствует повышенной вероятности возникновения метастазов [30–32] путем формирования ниши для метастазирующих клеток [33].

Выявлена значимость белков метаболизма меди как прогностических маркеров. Обнаружено, что повышенная экспрессия металлошаперона Atox1 (антиоксидант 1) связана с худшим течением рака молочной железы [34]. Этот факт подтвержден также на клетках миелогенного лейкоза и меланомы [35]. В случае меланомы с мутацией BRAF^{V600E} одним из объяснений может быть усиление фосфорилирования ERK1/2 (Ras-зависимой киназы, регулируемой внеклеточным сигналом) за счет способности меди аллостерически потенцировать активность MEK1/2 [36]. Предполагается, что этот механизм может работать и в

опухолях другого типа. Эта гипотеза косвенно подтверждается снижением пролиферации клеток немелкоклеточного рака легкого в ответ на нокдаун Atox1 [37]. Схожие данные получены для металлошаперона супероксид-дисмутазы (CCS) на клеточных культурах рака молочной железы [38]. Нокдаун этого металлошаперона снижает фосфорилирование ERK1/2. В то же время добавление N-ацетилцистеина устраняло эффект нокдауна CCS. Утверждается, что отсутствие CCS приводит к повышению уровня АФК, которые препятствуют эффективному фосфорилированию ERK1/2. Однако снижение экспрессии CCS, наоборот, рассматривается как показатель неблагоприятного прогноза при гепатоцеллюлярной карциноме [39]. Таким образом, повышение уровня экспрессии металлошаперонов меди зачастую способствует малигнизации, влияя на различные сигнальные пути и факторы, участвующие в регуляции клеточного цикла, однако этот показатель пока не может считаться универсальным и однозначным маркером определенного течения заболевания. По всей видимости, конкретные молекулярные механизмы могут по-разному реализовываться в опухолях разного происхождения. На рис. 1 представлена упрощенная схема внутриклеточного транспорта и метаболизма меди с указанием факторов, вовлеченных в процессы малигнизации.

МЕДЬ В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Учитывая роль меди в процессах, происходящих в опухолевых клетках, логичным выглядит выбор метаболизма данного металла в качестве мишени для терапии. На данный момент выделяется несколько категорий препаратов: 1) препараты, повышающие внутриклеточное содержание меди или реализующие за счет меди свое токсическое действие; 2) хелаторы, снижающие внутриклеточное содержание меди; 3) ингибиторы факторов, участвующих во внутриклеточном распределении меди.

Пока неясно, химические соединения каких классов окажутся наиболее эффективными против рака. Есть ряд примеров, когда увеличение содержания меди во внутриклеточном пуле может улучшить результат лечения. Так, повышенное содержание солей меди в культуральной среде усиливало экспрессию лиганда программируемой смерти PD-L1 в клетках гепатомы Нер3В и Нер1-6, в то время как хелаторы меди оказывали противоположный эффект [40]. Обнаружена сильная взаимосвязь между уровнями экспрессии переносчика меди CTR1 и PD-L1, что может объяснить описанный эффект. Медь-опосредованная стабилизация PD-L1 может облегчить терапию антителами против PD-L1 [41]. Существует множество органических комплексов меди, ко-

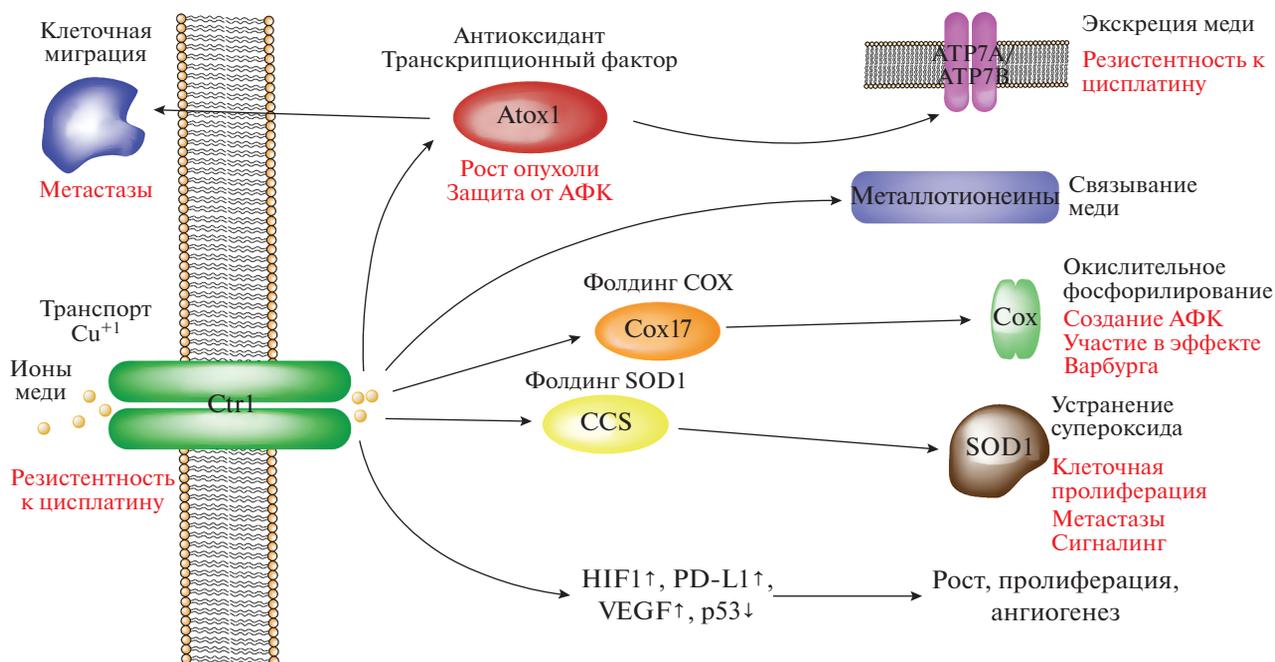


Рис. 1. Связь метаболизма ионов меди с прогрессирующим опухолем. Одновалентная медь попадает в клетку с транспортером Ctr1. Во внутриклеточном пространстве она связывается с металлотаперонами, металлотионеинами, церулоплазмином и глутатионом. Стрелками указаны функциональные связи между белками. Черным шрифтом обозначена функция факторов в здоровых клетках, красным – возможные эффекты при малигнизации. Подробности в тексте.

торые, как сообщается, обладают направленным цитотоксическим действием против опухолевых клеток. Механизм их действия преимущественно включает ингибирование протеасомной деградации, образование АФК, повреждение ДНК, индукцию различных форм гибели клеток (апоптоз, аутофагию и параптоз) [42]. Многие распространенные медьсодержащие соединения вызывают окислительный стресс с последующими разрывами ДНК, что приводит к индукции p53. Показана активация p53 при лечении крыс линии Вистар с глиобластомой органическим комплексом ТРТ- CuCl_2 (трифенилоловобензимидазолтиохлорид меди) *in vivo*, а также при воздействии соединением на клеточные линии человека – H1299 (не мелкоклеточный рак легкого), HeLa (рак шейки матки), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) [43]. Исследование, проведенное на моноцитах U937 (клетки p53-null) и клетках альвеолярной аденокарциномы A549 (содержат p53 дикого типа), показывает, что статус p53 влияет на способ гибели клеток: апоптоз в клетках с нормально функционирующим p53 или аутофагия в линиях с неактивным p53 при добавлении медных комплексов бистиосемикарбазонов [44].

Действие хелаторов, которые способны связывать медь, изолируя его от участия в различных метаболических процессах, противоположно действию лекарственных средств на основе меди. Терапия хелаторами постепенно развивается,

проводятся клинические испытания [45]. Показано, что такие хелаторы меди, как тетрагидромолибдат, могут подавлять рост и пролиферацию клеток меланомы, а также усиливать действие ингибиторов, направленных на каскад MAPK [25, 36]. Медь-депривационная терапия опухолей с различными мутациями в BRAF приводит к снижению пролиферативной активности и замедляет рост опухоли [46–48]. Дитиокарбаматы могут способствовать генерации АФК и активации внутренних путей апоптоза [49]. Показано также, что эти вещества нарушают взаимодействие между p53 и его супрессором Mdm2. Сходные эффекты вызывает и куркумин [50, 51]. Экспрессия циклина D1 – основного фактора прогрессии клеточного цикла и прохождения фазы G1/S – также снижается при добавлении куркумина, что интересно в свете недавнего открытия Atox1 как фактора транскрипции, который может связываться со специфическим промотором в гене циклина D1 [10]. Возможно, что эффект куркумина обусловлен нарушением функционирования Atox1 в результате хелатирования меди. Вдобавок, при изучении распространенных хелаторов меди – тетрагидромолибдата аммония и дисульфирама – в качестве противоопухолевых средств получены положительные результаты, в частности, в клинических испытаниях, где эти хелаторы комбинировали с препаратами на основе платины, а также на клетках рака молочной железы [52–54].

Дисульфирам в сочетании с различными таргетными ингибиторами и цитостатиками, включая оксалиплатин, оказывал более выраженный токсический эффект на клетки колоректального рака с мутированным p53, чем на клетки с p53 дикого типа (p53^{WT}) [55]. Интересно, что противоопухолевую активность дисульфирама можно усилить добавлением солей меди [56]. Этот эффект характерен и для других тиолсодержащих соединений [57, 58], что, по всей видимости, объясняется способностью таких соединений восстанавливать медь, приводя к генерации АФК. В табл. 1 приведены характеристики комплексов и хелаторов меди, связь медь-ассоциированных препаратов со статусом p53 и описание их совместных эффектов.

Хелаторы меди способны нарушать рост и пролиферацию опухолевых клеток, активируя механизмы апоптоза, однако они влияют на все факторы и белки, так или иначе связанные с метаболизмом меди, т.е. их действие не селективно. Появляются препараты, чья активность избирательна и направлена на конкретный элемент в системе контроля гомеостаза меди. Наиболее хорошо изучены ингибиторы SOD1 (супероксид-дисмутазы) 1), CCS (медный шаперон SOD) и Atox1. Ингибируя SOD1, 2-метоксиэстрадиол способен вызывать накопление p53 [63]. Изучение специфического ингибитора SOD1 – препарата ATN-224 – показало, что клеточная гибель индуцируется по-

средством активации каскада p38 MAPK и последующего снижения экспрессии антиапоптотического фактора MCL1. Однако наличие или отсутствие p53 не влияло на активность ATN-224 [65]. Эффективность DC_AC50 – ингибитора Atox1 и CCS – оценивали на культурах клеток рака молочной железы. Отмечено снижение выживаемости опухолевых клеток при минимальном влиянии на здоровые. Препарат оказывал влияние на транспорт ионов меди и ее накопление, вызывал окислительный стресс, дисфункцию некоторых сигнальных и метаболических путей, что в совокупности приводило к апоптозу [64, 66].

Таким образом, противоопухолевые эффекты медьсодержащих комплексов, хелаторов меди или химических ингибиторов факторов метаболизма меди очень похожи. Обычно они включают генерацию АФК либо за счет прямого участия меди в реакциях Фентона, либо за счет ингибирования функционирования антиоксидантных белков (таких, как SOD1), в составе которых есть медь. Помимо этого, депривация меди или ингибирование белков-участников ее метаболизма устраняет активность проонкогенных сигнальных путей, снижает пролиферацию клеток, а также ангиогенез и метастазирование. Комплексы меди вызывают окислительный стресс, повреждение ДНК, протеасомную деградацию и гибель клеток посредством различных механизмов. В большинстве случаев механизмы клеточной гибели

Таблица 1. Медьсодержащие препараты и p53

| Класс препарата | Препарат | Тип действия и индуцируемые эффекты | Ссылка |
|------------------|---|---|--------|
| Медные комплексы | TPT-CuCl ₂ | Генерация АФК, индукция p53, экспрессия проапоптотических генов | [43] |
| | Соединения на основе бистиосемикарбазона | Генерация АФК, перекисное окисление липидов, зависимость от статуса p53 аутофагия | [44] |
| | Комплекс Исатин–основание Шиффа–медь (II) | p53-зависимый апоптоз | [59] |
| | S-бензилдитиокарбазат | Снижение экспрессии мутантных форм p53, апоптоз, блок клеточного цикла в G2/M | [60] |
| | Комплекс меди с ди-2-пиридилгидразондитиокарбамат-s-уксусной кислотой | АФК-индуцируемое ингибирование пролиферации, p53-зависимый апоптоз, аутофагия | [49] |
| Медные хелаторы | Дитиокарбаматы | Генерация АФК, снижение экспрессии Mdm2, усиление экспрессии p53 | [61] |
| | Куркумин | Снижение экспрессии циклина D1 и p53 | [50] |
| | Куместерол | Фрагментация ДНК, образование АФК, активация p53/p21, остановка клеточного цикла в фазе G1/S, потеря мембранного потенциала митохондрий | [62] |
| Специфичные | 2-Метоксиэстрадиол | Ингибирование SOD1 и активация p53 | [63] |
| | DC_AC50 | Ингибирование Atox1 вызывает окислительный стресс и снижает уровень АТФ | [64] |

ли при действии таких препаратов реализуются через активацию p53. Кроме того, эффекты данных препаратов и процессы, на которые распространяется их влияние, очень сходны с эффектами, наблюдаемыми при активации опухолевого супрессора p53. В обоих случаях остановка клеточного цикла обусловлена ингибированием циклина D1. Окислительный стресс является важной составляющей индукции этих факторов с последующим осуществлением апоптотических процессов. Возникает вопрос, обусловлено ли это совпадение неспецифическим цитотоксическим действием или существует связь между метаболизмом меди и активностью p53?

МЕТАБОЛИЗМ МЕДИ И p53: ВЗАИМНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

Самая очевидная связь между гомеостазом меди и активностью p53 проистекает из цитотоксического действия переходного металла, который индуцирует образование АФК, повреждающих ДНК и запускающих стрессовый ответ с вовлечением p53 [7, 65, 66]. При этом Chen S.Y. и соавт. показали, что индукция p53 в ответ на экзогенный сульфат меди может зависеть от транскрипционного фактора DEC1 – белка, рассматриваемого в качестве опухолевого супрессора [23]. К сожалению, остается неясным, зависит ли этот эффект непосредственно от меди или обусловлен медь-опосредованной генерацией АФК.

Противоречивым выглядит следующий момент: в ряде случаев отмечено значительное снижение активности p53 как фактора транскрипции, несмотря на повышение его экспрессии в ответ на медь. Это может быть связано с действием АФК, которые вызывают мутации в гене *Trp53* или ошибки фолдинга белка p53, вследствие чего его функциональность бывает утеряна [69]. Не менее интересно, что добавление сульфата меди не приводит к накоплению АФК в опухолях с инактивированным p53 [70], хотя необходимо отметить, что в этом исследовании использовали относительно малые концентрации действующего вещества (около 25 мкМ, в то время как в других работах большинство внутриклеточных эффектов наблюдали в присутствии 200 мкМ сульфата меди [22, 69]). Это может указывать, что АФК не является единственным медиатором взаимосвязи p53 и меди, и именно непосредственное воздействие меди на p53 приводит к потере его функциональной активности, что, учитывая антионкогенные свойства нормально функционирующего p53, делает процесс малигнизации более вероятным [71]. Еще в 1995 году было показано, что ион Cu^{1+} при физиологических концентрациях способен связываться с p53 и подавлять его специфическое взаимодействие с ДНК посредством механизмов, не зависящих от образования

АФК [72]. Кроме того, одновалентная медь способна вытеснять цинк из комплекса с p53, вызывая его неправильный фолдинг с последующей потерей активности [71]. Также на клетках почки эмбриона человека HEK293 показано, что одновалентные ионы меди могут усиливать полиубиквитинирование и последующую деградацию p53 E2D-конъюгатом, которая имеет консервативный домен для связывания иона Cu^{1+} [73].

Таким образом, высокая внутриклеточная концентрация ионов меди может по-разному влиять на функционирование p53. С одной стороны, повреждение ДНК свободными радикалами может привести к индукции p53, с другой, активность p53 может угнетаться как повреждениями самого гена *TP53*, так и его продукта. Можно предположить, что логика регуляции зависит и от количества меди. Если медь поступает регулярно в относительно небольшой концентрации, то, в перспективе, возможна деградация p53 и возникновение мутаций в нем, снижение экспрессии и функциональной активности, что может приводить к малигнизации. Большие разовые дозы меди индуцируют продукцию АФК и повреждение ДНК, что, наоборот, ведет к активации p53, остановке клеточного цикла и апоптозу. Присутствие активного p53 в опухоли обычно способствует апоптотическим процессам, в то время как его отсутствие приводит к металлорезистентности. Таким образом, открытым остается вопрос о влиянии интенсивности и длительности воздействия на индуцированный мутагенез *TP53*.

На этом загадки регуляции не заканчиваются: парадоксальным образом добавление хелаторов также способно индуцировать повышение внутриклеточного уровня p53 [74]. В этом случае возможен запуск апоптоза как по внутреннему, так и по внешнему пути [75]. Результатом применения хелаторов также является индукция окислительного стресса, угнетение ангиогенеза, клеточная гибель, наблюдаемые и при повышении внутриклеточной концентрации меди. Эти эффекты, как уже упоминалось, реализуются через подавление функции медьсодержащих ферментов, таких как SOD. Это может указывать на строгую зависимость между действием медь-ассоциированных препаратов, индукции окислительного стресса и p53. Данная механистическая концепция не предполагает наличия каких-либо сложных сигнальных каскадов, необходимых для реализации таких эффектов. И она действительно имеет право на существование, однако не стоит забывать, что медь связывается многочисленными факторами и белками, поэтому концентрация свободных ионов меди в клетке остается чрезвычайно малой [76]. Как будут вести себя эти факторы и белки в присутствии различных концентраций меди? Какие сигналы и через какие механизмы они будут запускать? Как они связаны с выживанием и ги-

белю клеток? Возможно ли, что именно они провоцируют возникновение эффектов, описанных выше, и как тогда связаны метаболизм меди и сигнальная сеть p53? Ответы на эти вопросы помогут в поиске новых терапевтических комбинаций, выбор которых может быть основан на статусе p53 в опухолях.

Начнем с того, что выясним, с какими белками метаболизма меди непосредственно взаимодействует p53. Опубликована лишь информация о возможности взаимодействия между p53 и металлшапероном Atox1. Показана зависимость внутриядерного транспорта ионов меди шапероном Atox1 от активности p53 [77, 78]. С использованием двухгибридного анализа установлено, что в ядре Atox1 связывается со многими металлсодержащими ДНК-связывающими белками [79]. Взаимодействие Atox1 с p53 в этой работе не изучали, однако, учитывая общие каскады, оно не исключено.

Что касается взаимодействия на уровне генов, то известно, что экспрессия SCO2 – медного шаперона, ассоциированного со сборкой цитохром-с-оксидазы, находится под строгим контролем p53 [80–82]. Поскольку цитохром с – это один из ключевых белков электрон-транспортной цепи, осуществляющий перенос восстановленных эквивалентов на молекулярный кислород [83], не будет преувеличением сказать, что окислительно-восстановительные функции меди по крайней мере частично зависят от активности p53. Это особенно интересно в контексте участия p53 в эффекте Варбурга [84–86], важными составляющими в котором являются COX17 и SCO2. Стоит упомянуть, что в процессы малигнизации вовлечен также медный шаперон цитохром-с-оксидазы 17 (COX17) [87].

Существуют две медьсодержащие изоформы SOD: SOD1 (внутриклеточная) и SOD3 (внеклеточная) [88, 89]. Учеными Центра экспериментальной эндокринологии и онкологии (Италия) обнаружено, что сверхэкспрессия SOD3 в фибробластах мышцы приводит к увеличению экспрессии p53 и, что необычно, к снижению p21. Полученные результаты объясняются так называемым начальным пролиферативным всплеском – созданием множества репликативных вилок, которые при дальнейшей репликации не могут поддерживаться молекулярной машинерией, что ведет к повреждению ДНК и последующему апоптозу [90]. Что касается SOD1, то нокаут гена этой изоформы в фибробластах приводит к накоплению АФК, активации p53 и клеточной смерти [88]. Обнаружено также, что двойной нокаут *TP53/SOD1* в клетках значительно снижал частоту АФК-индуцированного апоптоза по сравнению с нокаутом только *TP53* [91]. На клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека

(HepG2) показано, что снижение экспрессии SOD1 вызвано повышением концентрации p53, который, возможно, регулирует SOD1, связываясь с белками инициации транскрипции [92]. Мутации гена *SOD1*, как показано на клетках нейробластомы, приводят к увеличению количества АФК, что активирует p53 и запускает апоптоз [93].

Также на клеточных линиях гепатомы обнаружена индукция экспрессии транспортера CTR1 в клетках с часто встречающейся мутацией Y220C в центральном домене p53 [94]. Обработка клеток HEK293 цисплатином приводила к значительному снижению индукции p53 в клетках с нокаутом CTR1, но это свидетельствует лишь о том, что CTR1 участвует в захвате цисплатина клеткой [95]. Одной из мишеней транскрипционного фактора p73, входящего в семейство p53, является экспрессия гена *ATP7A*, кодирующего трансмембранный белок-экспортер меди [96]. В работе Masaldan S. и соавт. показано, что индуцированное радиацией старение эмбриональных фибробластов MEF мышцы и сопутствующее накопление внутриклеточной меди, обусловленное повышением экспрессии Ctr1 и ослаблением экспрессии *ATP7A*, происходит только в присутствии p53 дикого типа [97]. Цитостатический препарат оксалиплатин способен к транслокации в клетку с помощью Ctr1. На резистентных к оксалиплатину клетках рака шейки матки человека установлено, что d-пеницилламин вызывает увеличение экспрессии фактора транскрипции Sp1, что, в свою очередь, обеспечивает транслокацию p53 из ядра в цитоплазму с дальнейшим его полиубиквитинированием и протеасомной деградацией, что ингибирует экспрессию *ATP7A* [98].

Iida T. и соавт. показали, что рибозим типа головки молотка (мотив РНК, который катализирует обратимые реакции ауторасщепления и аутолигирования в определенном участке молекулы), направленный против γ -глутамилцистеин-синтетазы, ключевого фермента биосинтеза глутатиона, увеличивает экспрессию p53 в клетках линии HCT8DDP резистентного к цисплатину рака толстой кишки [99]. Однако это влияние достаточно противоречиво, поскольку в другой работе, выполненной на линиях клеток колоректального рака, не обнаружили значимой связи экспрессии γ -глутамилцистеин-синтетазы и p53 [100]. Lin-Lee Y.-C. и соавт. также подтверждают, что вклад p53 в стимуляцию экспрессии γ -глутамилцистеин-синтетазы в значительной мере зависит от окружающих условий и конкретных мутаций p53 в различных клеточных линиях колоректального рака [101]. Необходимый элемент синтеза глутатиона – Na-независимый/C1-зависимый цистин-глутаминовый антипортер SLC7A11, который в обмен на глутамат транспортирует в клетку окисленную форму цистеина – цистин, находится под контролем p53. p53 репрессирует экспрессию

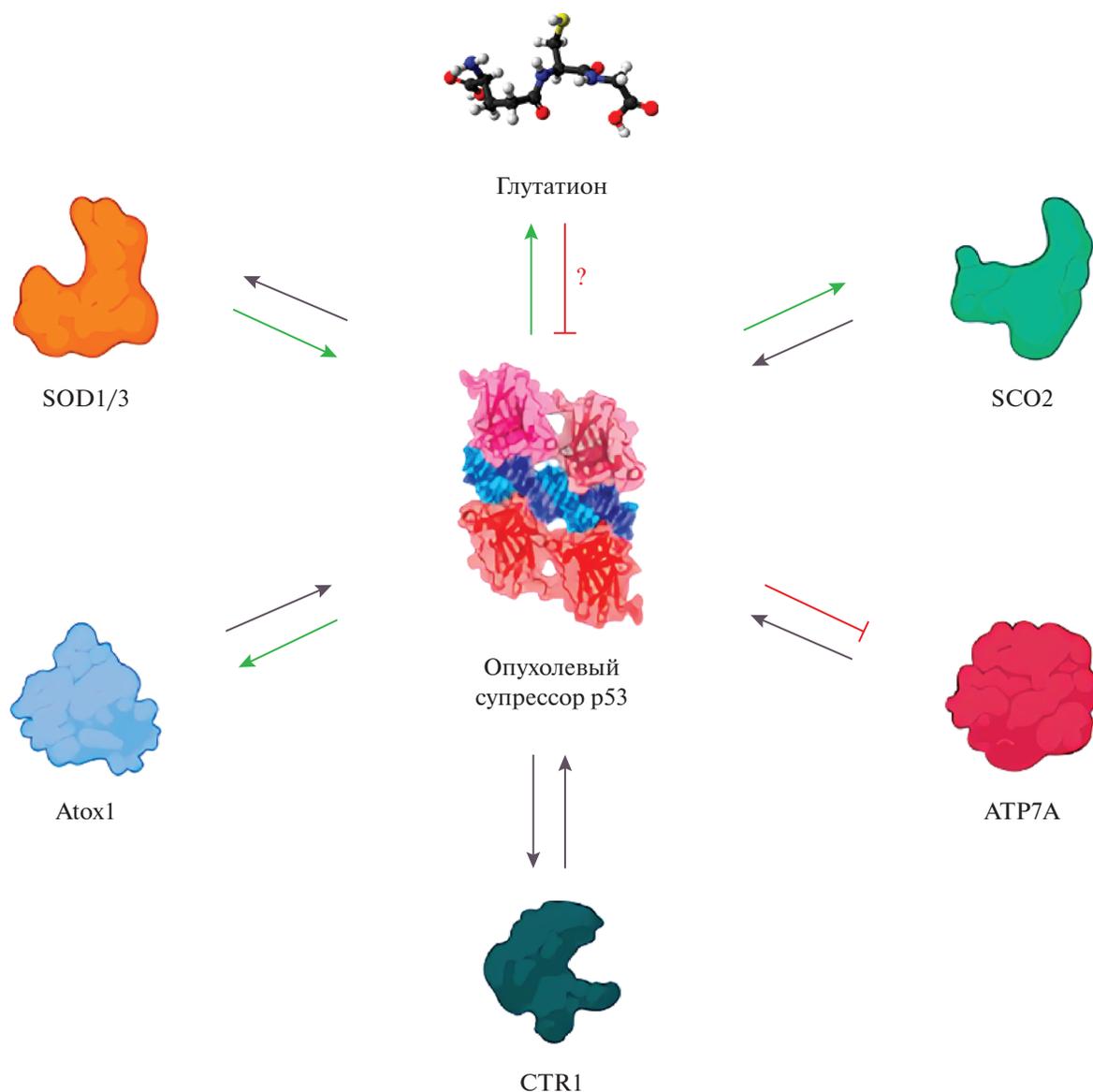


Рис. 2. Взаимная регуляция ассоциированных с медью молекул и p53. Зеленые стрелки указывают на усиление экспрессии; красные – на уменьшение; серые – отражают слабую связь или отсутствие связи; вопросительный знак – противоречивые данные. SOD – супероксид-дисмутаза; SCO2 – белок, связанный со сборкой цитохром-*c*-оксидазы; CTR1 – белок захвата меди 1; ATP7A – АТРазный транспортер меди альфа; Atox1 – медный шаперон антиоксидант 1. Создано с помощью Biorender.com.

SLC7A11, сенсibiliзируя таким образом опухолевые клетки к ферроптозу – типу клеточной смерти, в котором участвуют переходные металлы, в том числе медь [102]. Это еще раз доказывает важность изучения свойств p53 в зависимости от локализации и типа опухоли, мутаций и изоформ опухолевого супрессора.

Конечно, сложная структура регуляторной сети метаболизма меди только начинает проясняться, особенно в контексте развития опухолей. Несмотря на это, получены некоторые многообещающие данные о взаимной регуляции между связанными с медью молекулами и p53 (рис. 2).

Далее мы постараемся понять, каким образом можно использовать полученные знания в терапии опухолей и можно ли подобрать такую комбинацию препаратов и мишеней, которые в сумме дают синергический эффект в контексте метаболизма меди и статуса p53.

СВЯЗЬ p53 И МЕТАБОЛИЗМА МЕДИ – НОВЫЙ МАНЕВР ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Упомянутые работы указывают на прямую и опосредованную роль p53 в метаболизме меди и,

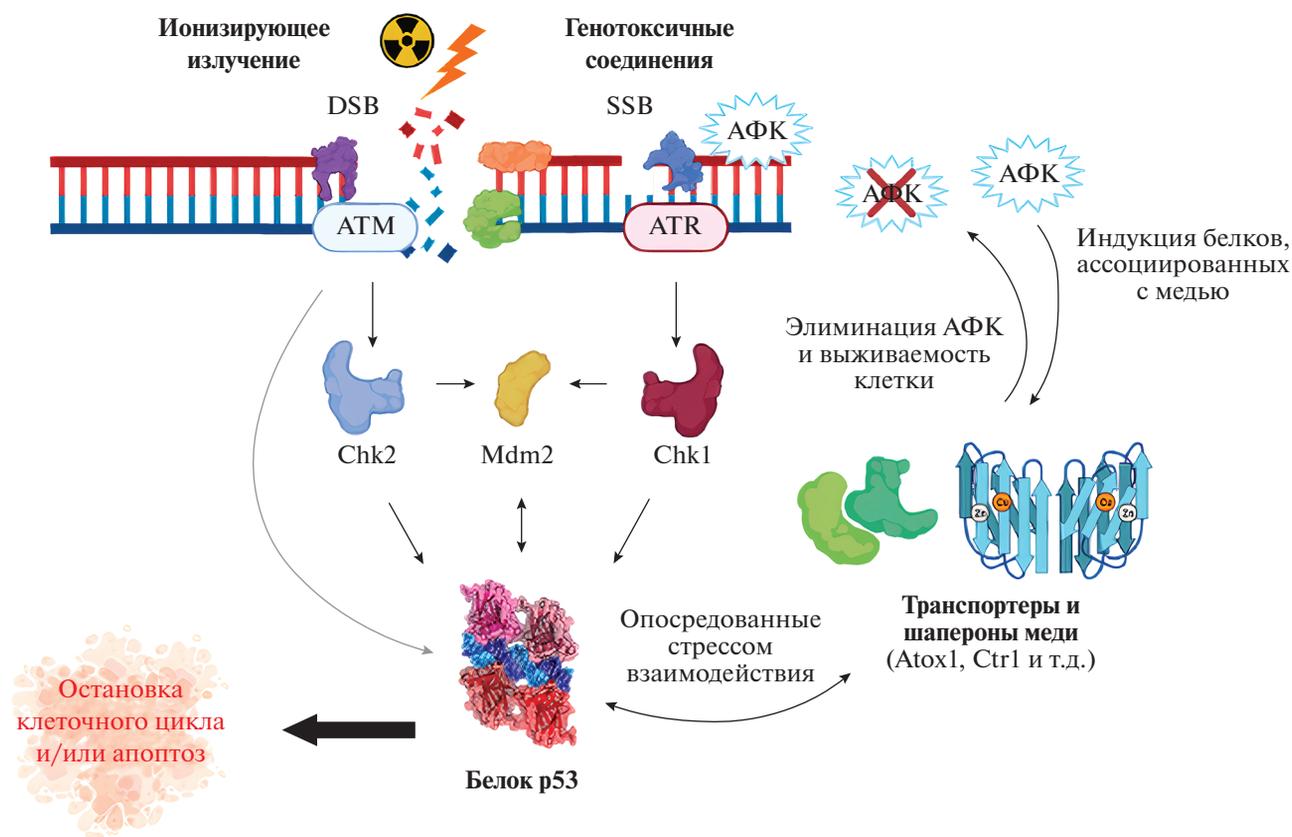


Рис. 3. Взаимодействие p53 и белков, ассоциированных с медью. Генотоксические агенты и ионизирующее излучение вызывают одноцепочечные (SSB) или двухцепочечные (DSB) разрывы ДНК, которые мгновенно воспринимаются p53. Этот белок связан с ответами на появление свободных радикалов и АФК, которые, в свою очередь, влияют на индукцию транспортеров и шаперонов меди. Этот каскад может опосредовать и обратный ответ — активировать или супрессировать p53. Такие функциональные петли вносят вклад в баланс выживаемости и гибели опухолевых клеток. Создано с помощью Biorender.com.

соответственно, в эффективности медь-ассоциированной терапии. Учитывая достижения в анализе функционирования регуляторной сети p53 и применении этих знаний в терапии опухолей, стоит направить наше внимание на использование соответствующего подхода к изучению регуляции метаболизма меди. Применяя препараты, активирующие или стабилизирующие p53, совместно с медь-ассоциированной терапией мы можем ожидать значительного снижения выживаемости опухолевых клеток. Взаимодействия между указанными факторами стали предметом пристального внимания исследователей, не в последнюю очередь потому, что их взаимосвязь оказалась намного сложнее, чем АФК-опосредованное повреждение ДНК (рис. 3).

Несмотря на слабую изученность участия p53 в регуляции гомеостаза меди, уже сейчас существует возможность применения наших знаний к разработке новых терапевтических подходов. Например, достаточно активно начинают проявляться взаимосвязи Atox1 с p53. В присутствии p53 белок Atox1 намного эффективнее транспо-

цируется в ядро и выполняет свои функции, в том числе контролирует экспрессию циклина D1 [10, 77]. Малая молекула DC_AC50, специфично связывающаяся с Atox1, успешно снижает пролиферативную активность линий клеток немелкоклеточного рака легкого человека (H1299), миелогенного лейкоза человека (K562), рака молочной железы человека (MDA-MB-231) и плоскоклеточного рака головы и шеи (Tu-212LN) [62]. Отмечена также генерация АФК и снижение синтеза АТР в результате добавления препарата DC_AC50. Если транскрипция или часть функций Atox1 находится под контролем p53, а он, в свою очередь, мутирован у конкретного пациента, то стоит ожидать низкой эффективности этого препарата у этого пациента. Таким образом, мы можем получить новый терапевтический маркер, способный повлиять на стратегию лечения. Как сказано выше, мы можем либо применять препараты, восстанавливающие активность p53, в сочетании с терапией, направленной на Atox1, либо выбирать другой курс лечения, что будет зависеть от конкретной мутации в p53. Отдельная задача состоит в

определении вклада каждой конкретной мутации p53 в опухолях разной локализации в эффективность действия ингибиторов Atox1.

Как уже отмечено, ингибирование SOD1 провоцирует аккумуляцию АФК и p53-зависимый апоптоз. Это отличает SOD1 от SOD3, которая функционирует преимущественно во внеклеточном пространстве. В опухолях с неактивным p53 ослаблен ответ на АФК [103]. Добавление индукторов или стабилизаторов p53, например, стиктиновой кислоты или производных карбазола [104] с одновременным ингибированием функции SOD1 при помощи диэтилдитиокарбамата (DDC) и тетраиомолибдата (ТМ) [105] должно давать синергический эффект за счет повышения уровня окислительного стресса при одновременной сенсибилизации опухолевой клетки к нему.

Ингибирование ангиогенеза при применении хелаторов меди может провоцировать гибель опухолевых клеток через индукцию гипоксии, к которой наиболее чувствительны опухоли с мутантным или неактивным p53 [106]. Опухолевый супрессор дикого типа способствует экспрессии белка SCO2, который, в свою очередь, позволяет опухолевым клеткам пережить период гипоксии с помощью индукции окислительного фосфорилирования [84]. Таким образом, статус p53 может учитываться при выборе стратегии лечения медными хелаторами. Добавление ингибиторов p53 будет, вероятно, способствовать лучшей выживаемости пациентов.

Металлотионеины (МТ) — это белки с низкой молекулярной массой и высоким содержанием цистеина, способные связываться с ионами металлов (цинк, медь, селен и др.) и транспортировать их. Оригинальные исследования указывают на существование прямой связи между связыванием цинка МТ и стабильностью дикой формы p53, что приводит к более выраженной клеточной гибели при генотоксических воздействиях [107, 108]. В работах последних лет показано, что медь может замещать цинк, связанный МТ, и приводить к аномальному фолдингу белка p53, подавляя его основные функции — репарацию повреждений и/или активацию апоптоза, значительно увеличивая вероятность развития опухолей (например, рака легкого, молочной железы) [71]. Кроме того, индукция p53 влияет на экспрессию цинксвязывающих МТ-1 (экспрессируется в клетках рака прямой кишки) и МТ-2А (в клетках рака желудка) зависимым от дозы меди образом, что, исходя из условий, ведет либо к стабилизации p53 — при связывании с Zn, либо к его мутациям и аномальному фолдингу — при накоплении Cu [109]. Это наводит на мысль о необходимости поиска ингибиторов связывания МТ с ионами меди во избежание появления аномальных форм p53 и развития неоплазии/резистент-

ности опухолей к терапевтическому вмешательству. Вероятно, такой группой могут быть высоко-селективные хелаторы меди, не захватывающие внутриклеточный цинк, такие как тетраиомолибдат. Второй вариант — разработка стабилизаторов связи МТ-Zn, которые, конкурируя за связь с Cu, не позволяли бы вытеснить металл из обозначенного комплекса.

Другой интересный участник — небелковый тиол глутатион. Ген глутатионпероксидазы, входящей в еще одну связанную с медью антиоксидантную систему, также находится под контролем p53 [110]. Более того, цистин-глутаминовый антипортёр SLC7A11, важнейший элемент синтеза глутатиона, не способен работать в клетках с точечными мутациями p53, которые найдены практически в половине всех злокачественных опухолей человека [111]. Эти факты свидетельствуют о большей уязвимости опухолей с мутациями p53 к воздействию АФК. Логично предположить, что использование медных комплексов, способных индуцировать апоптоз при помощи усиленного окислительного стресса, будет более оправданным в опухолях с мутациями в p53, чем в опухолях без мутации p53.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Медь, будучи биологически необходимым переходным металлом, способна влиять на многие жизненно важные процессы в клетке, способствуя росту, пролиферации, миграции и ангиогенезу. По этим же причинам медь вовлечена в процессы малигнизации и развития опухоли. Начинает проясняться роль этого металла в функционировании внутриклеточных сигнальных путей. Показано участие меди в фосфорилировании Erk киназой Mek1; ожидается, что новые исследования выявят и другие факторы, активность которых так или иначе регулируется медью, а также факторы, способные влиять на метаболизм меди путем обратной связи.

В данном обзоре мы указываем на потенциальную возможность таких взаимосвязей между различными формами меди и белком-супрессором опухолей p53. Анализ опубликованных данных позволил выявить прямое влияние ионов этого металла как на возникновение мутаций в гене TP53, так и на нарушение функций самого белка. Активация p53 в ответ на повышенные концентрации меди может происходить как при участии АФК, так и без них. Прямое влияние могут оказывать не только ионы меди, но и различные медьсодержащие белки.

Проанализирована регуляторная сеть, объединяющая факторы метаболизма меди с активностью p53, и установлены некоторые корреляции. Основными точками соприкосновения во взаим-

ном влиянии оказываются энергетический обмен (контроль окислительного фосфорилирования, метаболизм глюкозы), прохождение клеточного цикла, регуляция окислительно-восстановительного баланса и процессов клеточной гибели. Существует множество регуляторов и медиаторов, которые позволяют координировать транспорт и связывание меди в клетке, влияя на активацию p53. Почти каждый из этих регуляторов принимает то или иное участие в процессах развития опухоли и может использоваться в качестве мишени для разработки подходов к диагностике и противоопухолевой терапии, рассмотренных ранее. К наиболее перспективным для дальнейшего изучения относится взаимосвязь между p53 и металлошапероном Atox1, так как установлено не только участие Atox1 в метаболизме меди, но и его функционирование как транскрипционного фактора и участника регуляции экспрессии циклина D1. Нарушение статуса p53 может негативно сказываться на активности Atox1, его транскрипционной функции и усиливать процессы малигнизации. Подавление Atox1 специфическими ингибиторами при одновременной реактивации p53 может иметь заметный противоопухолевый эффект. Это также означает, что статус обоих белков должен учитываться при подборе схемы терапии. Кроме того, перспективными мишенями могут быть представляющие немалый интерес металлошапероны CCS и Cox17, так как уже описано их прогностическое значение, а конкретизация взаимодействия с p53 поможет глубже понять фундаментальную организацию этой сигнально-метаболической сети. Это можно сказать и о медьсодержащем белке SCO2, который, среди прочего, опосредует участие p53 в эффекте Варбурга.

В настоящее время уже создан задел для построения единой и четкой схемы взаимосвязи между белками метаболизма меди и активностью p53. Дальнейшие исследования должны быть направлены на конкретизацию механизмов межбелковых взаимодействий. Значение взаимосвязи всех перечисленных факторов с p53 для диагностических и терапевтических целей потенциально очень велико. Глубокое и детальное изучение этих взаимодействий в опухолях различной локализации при воздействии противоопухолевых препаратов, ионизирующего излучения, иммунотерапевтических агентов позволит разработать оптимальные комплексные схемы лечения опухолей.

Авторы благодарят А.А. Штиля за помощь и ценные советы в написании данного обзора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00588).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karginova O., Weekley C.M., Raoul A., Alsayed A., Wu T., Lee S.S., He C., Olopade O.I. (2019) Inhibition of copper transport induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells and suppresses tumor angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.* **18**, 873–885. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0667>
2. Li Y. (2020) Copper homeostasis: emerging target for cancer treatment. *IUBMB Life.* **72**, 1900–1908. <https://doi.org/10.1002/iub.2341>
3. Turski M.L., Thiele D.J. (2009) New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *J. Biol. Chem.* **284**, 717–721. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800055200>
4. Grubman A., White A.R. (2014) Copper as a key regulator of cell signalling pathways. *Expert Rev. Mol. Med.* **16**, E11. <https://doi.org/10.1017/erm.2014.11>
5. Shao S., Si J., Shen Y. (2019) Copper as the target for anticancer nanomedicine. *Adv. Ther.* **2**, 1800147. <https://doi.org/10.1002/adtp.201800147>
6. Chen J. (2016) The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026104. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026104>
7. Olovnikov I.A., Kravchenko J.E., Chumakov P.M. (2009) Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.11.005>
8. Itahana Y., Itahana K. (2018) Emerging roles of p53 family members in glucose metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 776. <https://doi.org/10.3390/ijms19030776>
9. Cheung E.C., Vousden K.H. (2010) The role of p53 in glucose metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.006>
10. Itoh S., Kim H.W., Nakagawa O., Ozumi K., Lessner S.M., Aoki H., Akram K., McKinney R.D., Ushio-Fukai M., Fukai T. (2008) Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **283**, 9157–9167. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709463200>
11. Dzebo M.M., Blockhuys S., Valenzuela S., Celauro E., Esbjörner E.K., Wittung-Stafshede P. (2018) Copper chaperone Atox1 interacts with cell cycle proteins. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **16**, 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.10.018>
12. Won K.Y., Lim S.J., Kim G.Y., Kim Y.W., Han S.A., Song J.Y., Lee D.K. (2012) Regulatory role of p53 in cancer metabolism via SCO2 and TIGAR in human breast cancer. *Hum. Pathol.* **43**, 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.04.021>
13. Zhang F., Zheng W., Yao W. (2020) Effects of dietary copper level on the tissue morphology, copper metabolism and redox balance of intestines and liver in SD rats.

- J. Nanjing Agric. Univ.* **43**, 728–739.
<https://doi.org/10.7685/jnau.201907029>
14. Maillat A., Pervaiz S. (2012) Redox regulation of p53, redox effectors regulated by p53: a subtle balance. *Antioxidants Redox Signal.* **16**, 1285–1294.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.4434>
 15. Martinez-Outschoorn U.E., Peiris-Pagés M., Pestell R.G., Sotgia F., Lisanti M.P. (2017) Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 11–31.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.60>
 16. DeBerardinis R.J., Chandel N.S. (2016) Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* **2**, e1600200.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
 17. Shanbhag V.C., Gudekar N., Jasmer K., Papageorgiou C., Singh K., Petris M.J. (2021) Copper metabolism as a unique vulnerability in cancer. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res.* **1868**, 118893.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118893>
 18. Gupte A., Mumper R.J. (2009) Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* **35**, 32–46.
<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.004>
 19. Gérard C., Bordeleau L.-J., Barralet J., Doillon C.J. (2010) The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials.* **31**, 824–831.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.009>
 20. Sen C.K., Khanna S., Venojarvi M., Trikha P., Ellison E.C., Hunt T.K., Roy S. (2002) Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **282**, H1821–H1827.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01015.2001>
 21. Li Q., Ding X., Kang Y.J. (2014) Copper promotion of angiogenesis in isolated rat aortic ring: role of vascular endothelial growth factor. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 44–49.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.08.013>
 22. Rigracciolo D.C., Scarpelli A., Lappano R., Pisano A., Santolla M. F., Marco P.D., Cirillo F., Cappello A.R., Dolce V., Belfiore A., Maggiolini M., Francesco E.M.D. (2015) Copper activates HIF-1 α /GPER/VEGF signalling in cancer cells. *Oncotarget.* **6**, 34158–34177.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5779>
 23. Chen S.Y., Liu S.T., Lin W.R., Lin C.K., Huang S.M. (2019) The mechanisms underlying the cytotoxic effects of copper via differentiated embryonic chondrocyte gene 1. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5225.
<https://doi.org/10.3390/ijms20205225>
 24. Wu Z., Zhang W., Kang Y.J. (2018) Copper affects the binding of HIF-1 α to the critical motifs of its target genes. *Metallomics.* **11**, 429–438.
<https://doi.org/10.1039/c8mt00280k>
 25. Brady D.C., Crowe M.S., Turski M.L., Hobbs G.A., Yao X., Chaikwad A., Knapp S., Xiao K., Campbell S.L., Thiele D.J., Counter C.M. (2014) Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis. *Nature.* **509**, 492–496.
<https://doi.org/10.1038/nature13180>
 26. Ostrakhovitch E.A., Lordnejad M.R., Schliess F., Sies H., Klotz L.O. (2002) Copper ions strongly activate the phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway independent of the generation of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 232–239.
<https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2559>
 27. He F., Chang C., Liu B., Li Z., Li H., Cai N., Wang H.H. (2019) Copper(II) ions activate ligand-independent receptor tyrosine kinase (RTK) signaling pathway. *Biomed. Res. Int.* **2019**, 4158415.
<https://doi.org/10.1155/2019/4158415>
 28. Mattie M.D., McElwee M.K., Freedman J.H. (2008) Mechanism of copper-activated transcription: activation of AP-1, and the JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways. *J. Mol. Biol.* **383**, 1008–1018.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.080>
 29. Tsang T., Posimo J.M., Gudiel A.A., Cicchini M., Feldser D.M., Brady D.C. (2020) Copper is an essential regulator of the autophagic kinases ULK1/2 to drive lung adenocarcinoma. *Nat. Cell. Biol.* **22**, 412–424.
<https://doi.org/10.1038/s41556-020-0481-4>
 30. Ye M., Zhou J., Gao Y., Pan S., Zhu X. (2020) The prognostic value of the lysyl oxidase family in ovarian cancer. *J. Clin. Lab. Anal.* **34**, e23538.
<https://doi.org/10.1002/jcla.23538>
 31. Choi J., Chung T., Rhee H., Kim Y.J., Jeon Y., Yoo J.E., Noh S., Han D.H., Park Y.N. (2019) Increased expression of the matrix-modifying enzyme lysyl oxidase-like 2 in aggressive hepatocellular carcinoma with poor prognosis. *Gut. Liver.* **13**, 83–92.
<https://doi.org/10.5009/gnl17569>
 32. Zhang X., Su M.-W., Cheng Y., Martinka M., Wang G., Huang Y., Li L., Zhou Y. (2021) Immunohistochemistry analysis reveals lysyl oxidase-like 3 as a novel prognostic marker for primary melanoma. *Melanoma Res.* **31**, 173–177.
<https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000720>
 33. Johnston K.A., Lopez K.M. (2018) Lysyl oxidase in cancer inhibition and metastasis. *Cancer Lett.* **417**, 174–181.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.006>
 34. Blockhuys S., Brady D.C., Wittung-Stafshede P. (2020) Evaluation of copper chaperone ATOX1 as prognostic biomarker in breast cancer. *Breast Cancer.* **27**, 505–509.
<https://doi.org/10.1007/s12282-019-01044-4>
 35. Kim Y.-J., Bond G.J., Tsang T., Posimo J.M., Busino L., Brady D. C. (2019) Copper chaperone ATOX1 is required for MAPK signaling and growth in BRAF mutation-positive melanoma. *Metallomics.* **11**, 1430–1440.
<https://doi.org/10.1039/c9mt00042a>
 36. Brady D.C., Crowe M.S., Greenberg D.N., Counter C.M. (2017) Copper chelation inhibits BRAFV600E-driven melanomagenesis and counters resistance to BRAFV600E and MEK1/2 inhibitors. *Cancer Res.* **77**, 6240–6252.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1190>
 37. Cai H., Peng F. (2013) Knockdown of copper chaperone antioxidant-1 by RNA interference inhibits copper-stimulated proliferation of non-small cell lung carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **30**, 269–275.
<https://doi.org/10.3892/or.2013.2436>
 38. Li Y., Liang R., Zhang X., Wang J., Shan C., Liu S., Leilei Li L., Zhang S. (2019) Copper chaperone for superoxide dismutase promotes breast cancer cell prolifer-

- eration and migration via ROS-mediated MAPK/ERK signaling. *Front. Pharmacol.* **10**, 356.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00356>
39. Wen C., Shan C., Sun W., Wan Y., Lin R., Chen B., Dai H., Tang K., Xiang X., Yang J., Li N., Yonghui H. (2022) Copper chaperone for superoxide dismutase expression is downregulated and correlated with more malignant tumoral features and poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Res. Sq.* 1–16.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-100249/v1>
 40. Zhou B., Guo L., Zhang B., Liu S., Zhang K., Yan J., Zhang W., Yu M., Chen Z., Xu Y., Xiao Y., Zhou J., Fan J., Li H., Ye Q. (2019) Disulfiram combined with copper induces immunosuppression via PD-L1 stabilization in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* **9**, 2442–2455.
 41. Voli, F., Valli, E., Lerra, L., Saletta, F., Giorgi, F., Mercatelli D., Rouaen J.R.C., Shen S., Murray J.E., Ahmed-Cox A., Cirillo G., Mayoh C., Beavis P.A., Haber M., Trapani J.A., Kavallaris M., Vittorio O. (2020) Intratumoral copper modulates PD-L1 expression and influences tumor immune evasion. *Cancer Res.* **80**, 4129–4144.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0471>
 42. Santini C., Pellei M., Gandin V., Porchia M., Tisato F., Marzano C. (2014) Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem. Rev.* **114**, 815–862.
<https://doi.org/10.1021/cr400135x>
 43. Höti N., Zhu D., Song Z., Wu Z., Tabassum S., Wu M. (2004) p53-dependent apoptotic mechanism of a new designer bimetallic compound tri-phenyl tin benzimidazolethiol copper chloride (TPT-CuCl₂): *in vivo* studies in Wistar rats as well as *in vitro* studies in human cervical cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 22–33.
<https://doi.org/10.1124/jpet.104.069104>
 44. Bisceglie F., Alinovi R., Pinelli S., Galetti M., Pioli M., Tarasconi P., Mutti A., Goldoni M., Pelosi G. (2016) Autophagy and apoptosis: studies on the effects of bis-thiosemicarbazone copper(II) complexes on p53 and p53-null tumour cell lines. *Metallomics.* **8**, 1255–1265.
<https://doi.org/10.1039/c6mt00170j>
 45. Ge E.J., Bush A.I., Casini A., Cobine P.A., Cross J.R., DeNicola G.M., Dou Q.P., Franz K.J., Gohil V.M., Gupta S., Kaler S.G., Lutsenko S., Mittal V., Petris M.J., Polishchuk R., Ralle M., Schilsky M.L., Tonks N.K., Vahdat L.T., Aelst L.V., Xi D., Yuan P., Brady D.C., Chang C.J. (2022) Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia. *Nat. Rev. Cancer.* **22**, 102–113.
<https://doi.org/10.1038/s41568-021-00417-2>
 46. Xu M., Casio M., Range D.E., Sosa J.A., Counter C.M. (2018) Copper chelation as targeted therapy in a mouse model of oncogenic BRAF-driven papillary thyroid cancer. *Clin. Cancer Res.* **24**, 4271–4281.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3705>
 47. Sammons S., Brady D., Vahdat L., Salama A.K.S. (2016) Copper suppression as cancer therapy: the rationale for copper chelating agents in BRAFV600 mutated melanoma. *Melanoma Manag.* **3**, 207–216.
<https://doi.org/10.2217/mmt-2015-0005>
 48. Baldari S., Di Rocco G., Heffern M.C., Su T.A., Chang C.J., Toietta G. (2019) Effects of copper chelation on BRAFV600E positive colon carcinoma cells. *Cancers (Basel).* **11**, 659.
<https://doi.org/10.3390/cancers11050659>
 49. Wang T., Liu Y., Fu Y., Huang T., Yang Y., Li S., Li C. (2017) Antiproliferative activity of di-2-pyridylhydrazine dithiocarbamate acetate partly involved in p53 mediated apoptosis and autophagy. *Int. J. Oncol.* **51**, 1909–1919.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4149>
 50. Shanmugam M.K., Rane G., Kanchi M.M., Arfuso F., Chinnathambi A., Zayed M.E., Alharbi S.A., Tan B.K.H., Kumar A.P., Sethi G. (2015) The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules.* **20**, 2728–2769.
<https://doi.org/10.3390/molecules20022728>
 51. Zhang W., Chen C., Shi H., Yang M., Liu Y., Ji P., Chen H., Tan R.X., Li E. (2016) Curcumin is a biologically active copper chelator with antitumor activity. *Phytomedicine.* **23**, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.11.005>
 52. Rieber M. (2020) Cancer pro-oxidant therapy through copper redox cycling: repurposing disulfiram and tetrathiomolybdate. *Curr. Pharm. Des.* **26**, 4461–4466.
<https://doi.org/10.2174/1381612826666200628022113>
 53. Skrott Z., Mistrik M., Andersen K.K., Friis S., Majera D., Gursky J., Ozdian T., Bartkova J., Turi Z., Moudry P., Kraus M., Michalova M., Vaclavkova J., Dzubak P., Vrobel I., Pouckova P., Sedlacek J., Miklovcova A., Kutt A., Li J., Mattova J., Driessen C., Dou Q.P., Olsen J., Hajduch M., Cvek B., Deshaies R.J., Bartek J. (2017) Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4. *Nature.* **552**, 194–199.
<https://doi.org/10.1038/nature25016>
 54. Li Y., Chen F., Chen J., Chan S., He Y., Liu W., Zhang G. (2020) Disulfiram/copper induces antitumor activity against both nasopharyngeal cancer cells and cancer-associated fibroblasts through ROS/MAPK and ferroptosis pathways. *Cancers (Basel).* **12**, 138.
<https://doi.org/10.3390/cancers12010138>
 55. Calderon-Aparicio A., Cornejo A., Orue A., Rieber M. (2019) Anticancer response to disulfiram may be enhanced by co-treatment with MEK inhibitor or oxaliplatin: modulation by tetrathiomolybdate, KRAS/BRAF mutations and c-MYC/p53 status. *Ecancermedical-science.* **13**, 890.
<https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.890>
 56. Li H., Wang J., Wu C., Wang L., Chen Z.S., Cui W. (2020) The combination of disulfiram and copper for cancer treatment. *Drug Discov. Today.* **25**(6), 1099–1108.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.04.003>
 57. Tsymbal S.A., Moiseeva A.A., Agadzhanian N.A., Efimova S. S., Markova A. A., Guk D.A., Krasnovskaya O.O., Alpatova V.M., Zaitsev A.V., Shibaeva A.V., Tatarskiy V.V., Dukhinova M.S., Ol'shevskaya V.A., Ostroumova O.S., Beloglazkina E.K., Shtil A.A. (2021) Copper-containing nanoparticles and organic complexes: metal reduction triggers rapid cell death via oxidative burst. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11065.
<https://doi.org/10.3390/ijms222011065>
 58. Zheng J., Lou J.R., Zhang X.-X., Benbrook D.M., Hanigan M.H., Lind S.E., Ding W.Q. (2010) N-Acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death. *Can-*

- cer Lett.* **298**, 186–194.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.07.003>
59. Bulatov E., Sayarova R., Mingaleeva R., Miftakhova R., Gomzikova M., Ignatyev Y., Petukhov A., Davidovich P., Rizvanov A., Barlev N.A. (2018) Isatin–Schiff base–copper (II) complex induces cell death in p53-positive tumors. *Cell Death Discov.* **4**, 103.
<https://doi.org/10.1038/s41420-018-0120-z>
60. Foo J.B., Low M.L., Lim J.H., Lor Y.Z., Zainol Abidin R., Dam V.E., Rahman N.A., Beh C.Y., Chan L.C., How C.W., Tor Y.S., Yazan L.S. (2018) Copper complex derived from S-benzylthiocarbamate and 3-acetyloumarin induced apoptosis in breast cancer cell. *BioMetals.* **31**, 505–515.
<https://doi.org/10.1007/s10534-018-0096-4>
61. Li Y., Qi H., Li X., Hou X., Lu X., Xiao X. (2015) A novel dithiocarbamate derivative induces cell apoptosis through p53-dependent intrinsic pathway and suppresses the expression of the E6 oncogene of human papillomavirus 18 in HeLa cells. *Apoptosis.* **20**, 787–795.
<https://doi.org/10.1007/s10495-015-1114-4>
62. Zafar A., Singh S., Naseem I. (2017) Cytotoxic activity of soy phytoestrogen coumestrol against human breast cancer MCF-7 cells: insights into the molecular mechanism. *Food Chem. Toxicol.* **99**, 149–161.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.034>
63. Huang P., Feng L., Oldham E.A., Keating M.J., Plunkett W. (2000) Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature.* **407**, 390–395.
<https://doi.org/10.1038/35030140>
64. Wang J., Luo C., Shan C., You Q., Lu J., Elf S., Zhou Y., Wen Y., Vinkenborg J.L., Fan J., Kang H., Lin R., Han D., Xie Y., Karpus J., Chen S., Ouyang S., Luan C., Zhang N., Ding H., Merx M., Liu H., Chen J., Jiang H., He C. (2015) Inhibition of human copper trafficking by a small molecule significantly attenuates cancer cell proliferation. *Nat. Chem.* **7**, 968–979.
<https://doi.org/10.1038/nchem.2381>
65. Glasauer A., Sena L.A., Diebold L.P., Mazar A.P., Chandel N.S. (2014) Targeting SOD1 reduces experimental non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Invest.* **124**, 117–128.
<https://doi.org/10.1172/JCI171714>
66. Karginova O., Weekley C.M., Raoul A., Alsayed A., Wu T. (2019) Inhibition of copper transport induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells and suppresses tumor angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.* **18**, 873–885.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0667>
67. Ostrakhovitch E.A., Cherian M.G. (2004) Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc. *Arch. Biochem. Biophys.* **423**, 351–361.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.01.004>
68. Verhaegh G.W., Richard M.J., Hainaut P. (1997) Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5699–5706.
<https://doi.org/10.1128/MCB.17.10.5699>
69. Tassabehji N.M., Vanlandingham J.W., Levenson C.W. (2005) Copper alters the conformation and transcriptional activity of the tumor suppressor protein p53 in human Hep G2 cells. *Exp. Biol. Med.* **230**, 699–708.
<https://doi.org/10.1177/153537020523001002>
70. Ostrakhovitch E.A., Cherian M.G. (2005) Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. *Apoptosis.* **10**, 111–121.
<https://doi.org/10.1007/s10495-005-6066-7>
71. Formigari A., Gregianin E., Irato P. (2013) The effect of zinc and the role of p53 in copper-induced cellular stress responses. *J. Appl. Toxicol.* **33**, 527–536.
<https://doi.org/10.1002/jat.2854>
72. Hainaut P., Rolley N., Davies M., Milner J. (1995) Modulation by copper of p53 conformation and sequence-specific DNA binding: role for Cu(II)/Cu(I) redox mechanism. *Oncogene.* **10**, 27–32.
73. Opazo C.M., Lotan A., Xiao Z., Zhang B., Greenough M.A., Lim C.M., Trytell H., Ramírez A., Ukulela A.A., Mawal C.H., McKenna J., Saunders D.N., Burke R., Gooley P.R., Bush A.I. (2021) Nutrient copper signaling promotes protein turnover by allosteric activation of ubiquitin E2D conjugases. *bioRxiv.*
<https://doi.org/10.1101/2021.02.15.431211>
74. Narayanan V.S., Fitch C.A., Levenson C.W. (2001) Tumor suppressor protein p53 mRNA and subcellular localization are altered by changes in cellular copper in human HepG2 cells. *J. Nutr.* **131**, 1427–1432.
<https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1427>
75. Santos S., Silva A.M., Matos M., Monteiro S.M., Álvaro A.R. (2016) Copper induced apoptosis in Caco-2 and HepG2 cells: Expression of caspases 3, 8 and 9, AIF and p53. *Comp. Biochem. Physiol. Part. C Toxicol. Pharmacol.* **185–186**, 138–146.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.010>
76. Dameron C.T., Harrison M.D. (1998) Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 1091S–1097S.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.1091S>
77. Beaino W., Guo Y., Chang A.J., Anderson C.J. (2014) Roles of Atox1 and p53 in the trafficking of copper-64 to tumor cell nuclei: implications for cancer therap. *J. Biol. Inorg. Chem.* **19**, 427–438.
<https://doi.org/10.1007/s00775-013-1087-0>
78. Eiblmaier M., Meyer L.A., Anderson C.J. (2008) The role of p53 in the trafficking of copper-64 to tumor cell nuclei. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 63–69.
<https://doi.org/10.4161/cbt.7.1.5130>
79. Öhrvik H., Wittung-Stafshede P. (2015) Identification of new potential interaction partners for human cytoplasmic copper chaperone Atox1: roles in gene regulation? *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 16728–16739.
<https://doi.org/10.3390/ijms160816728>
80. Matoba S., Kang J.-G., Patino W.D., Wragg A., Boehm M., Gavrillova O., Hurley P.J., Bunz F., Hwang P.M. (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science.* **312**, 1650–1653.
<https://doi.org/10.1126/science.1126863>
81. Papadopoulou L.C., Sue C.M., Davidson M.M., Tanji K., Nishino I., Sadlock J.E., Krishna S., Walker W., Selby J., Glerum D.M., Coster R.V., Lyon G., Scalais E., Lebel R., Kaplan P., Shanske S., Vivo D.C.D., Bonilla E., Hirano M., DiMauro S., Schon E.A. (1999) Fatal infantile

- cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat. Genet.* **23**, 333–337.
<https://doi.org/10.1038/15513>
82. Horng Y.-C., Leary S.C., Cobine P.A., Young F.B.J., George G.N., Shoubridge E.A., Winge D.R. (2005) Human Sco1 and Sco2 function as copper-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **280**, 34113–34122.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M506801200>
 83. Capaldi R.A. (1990) Structure and function of cytochrome *c* oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 569–596.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.003033>
 84. Zhang C., Liu J., Liang Y., Wu R., Zhao Y., Hong X., Lin M., Yu H., Liu L., Levine A.J., Hu W., Feng Z. (2013) Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat. Commun.* **4**, 2935.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3935>
 85. Rajeshkumar N.V., Dutta P., Yabuuchi S., De Wilde R.F., Martinez G.V., Le A., Kamphorst J.J., Rabinowitz J.D., Jain S.K., Hidalgo M., Dang C.V., Gillies R.J., Maitra A. (2015) Therapeutic targeting of the Warburg effect in pancreatic cancer relies on an absence of p53 function. *Cancer Res.* **75**, 3355–3364.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0108>
 86. Wanka C., Brucker D.P., Bähr O., Ronellenfitsch M., Weller M., Steinbach J.P., Rieger J. (2012) Synthesis of cytochrome *c* oxidase 2: a p53-dependent metabolic regulator that promotes respiratory function and protects glioma and colon cancer cells from hypoxia-induced cell death. *Oncogene.* **31**, 3764–3776.
<https://doi.org/10.1038/onc.2011.530>
 87. Singh R.P., Jeyaraju D.V., Voisin V., Xu C., Barghout S.H., Khan D.H., Hurren R., Gronda M., Wang X., Jitkova Y., Sharon D., Hon S.U.L., Soriano J., Lechman E.R., Lean N.M., Minden M.D., Chan S.M., Dick J.E., Bader G.D., Schimmer A. (2018) Targeting the mitochondrial metallochaperone Cox17 reduces DNA methylation and promotes AML differentiation through a copper dependent mechanism. *Blood.* **132**, 1339.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-111015>
 88. Watanabe K., Shibuya S., Koyama H., Ozawa Y., Toda T., Yokote K., Shimizu T. (2013) Sod1 loss induces intrinsic superoxide accumulation leading to p53-mediated growth arrest and apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 10998–11010.
<https://doi.org/10.3390/ijms140610998>
 89. Kamiya T., Takeuchi K., Fukudome S., Hara H., Adachi T. (2018) Copper chaperone antioxidant-1, Atox-1, is involved in the induction of SOD3 in THP-1 cells. *BioMetals.* **31**, 61–68.
<https://doi.org/10.1007/s10534-017-0067-1>
 90. Parascandolo A., Laukkanen M.O. (2021) SOD3 is a non-mutagenic growth regulator affecting cell migration and proliferation signal transduction. *Antioxidants.* **10**, 635.
<https://doi.org/10.3390/antiox10050635>
 91. Watanabe K., Shibuya S., Ozawa Y., Toda T., Shimizu T. (2021) Pathological relationship between intracellular superoxide metabolism and p53 signaling in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3548.
<https://doi.org/10.3390/ijms22073548>
 92. Cho G., Kang S., Seo S.J., Kim Y., Jung G. (1997) The transcriptional repression of the human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) gene by the anticancer drug, mitocycin C(MMC). *IUBMB Life.* **42**, 949–956.
<https://doi.org/10.1080/15216549700203391>
 93. Barbosa L.F., Cerqueira F.M., Macedo A.F.A., Garcia C.C., Angeli J.P.F., Schumacher R.I., Sogayar M.C., Augusto O., Carri M.T., Mascio P.D., Medeiros M.H.G. (2010) Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis. Dis.* **1802**, 462–471.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.01.011>
 94. Arciello M., Longo A., Viscomi C., Capo C., Angeloni A., Rossi L., Balsano C. (2015) Core domain mutant Y220C of p53 protein has a key role in copper homeostasis in case of free fatty acids overload. *BioMetals.* **28**, 1017–1029.
<https://doi.org/10.1007/s10534-015-9886-0>
 95. Pabla N., Murphy R.F., Liu K., Dong Z. (2009) The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Physiol. Physiol.* **296**, F505–F511.
<https://doi.org/10.1152/ajprenal.90545.2008>
 96. Lopriore P., Capitanio N., Panatta E., Di Daniele N., Gambacurta A., Melino G., Amelio I. (2018) TAp73 regulates ATP7A: possible implications for ageing-related diseases. *Aging (Albany NY).* **10**, 3745–3760.
<https://doi.org/10.18632/aging.101669>
 97. Masaldan S., Clatworthy S.A.S., Gamell C., Smith Z.M., Francis P.S., Denoyer D., Meggyesy P.M., LaFontaine S., Caterae M.A. (2018) Copper accumulation in senescent cells: interplay between copper transporters and impaired autophagy. *Redox Biol.* **16**, 322–331.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.03.007>
 98. Chen S.J., Kuo C.C., Pan H.Y., Tsou T.C., Yeh S.C., Chang J.Y. (2015) Mechanistic basis of a combination d-penicillamine and platinum drugs synergistically inhibits tumor growth in oxaliplatin-resistant human cervical cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* **95**, 28–37.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.03.006>
 99. Iida T., Kijima H., Urata Y., Goto S., Ihara Y., Oka M., Kohno S., Scanlon K.J., Kondo T. (2001) Hammerhead ribozyme against γ -glutamylcysteine synthetase sensitizes human colonic cancer cells to cisplatin by down-regulating both the glutathione synthesis and the expression of multidrug resistance proteins. *Cancer Gene Ther.* **8**, 803–814.
<https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700371>
 100. Tatebe S., Unate H., Sinicrope F.A., Sakatani T., Sugamura K., Makino M., Ito H., Savaraj N., Kaibara N., Kuo M.T. (2002) Expression of heavy subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase (gamma-GCSh) in human colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer.* **97**, 21–27.
<https://doi.org/10.1002/ijc.1574>
 101. Lin-Lee Y.-C., Tatebe S., Savaraj N., Ishikawa T., Kuo M.T. (2001) Differential sensitivities of the *MRP* gene family and γ -glutamylcysteine synthetase to prooxidants in human colorectal carcinoma cell lines with different p53 status. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 555–563.
[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00592-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00592-X)

102. Jiang L., Kon N., Li T., Wang S.J., Su T., Hibshoosh H., Baer R., Gu W. (2015) Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*. **520**, 57–62. <https://doi.org/10.1038/nature14344>
103. Montero J., Dutta C., van Bodegom D., Weinstock D., Letai A. (2013) p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death Differ.* **20**, 1465–1474. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.52>
104. Miller J.J., Gaiddon C., Storr T. (2020) A balancing act: using small molecules for therapeutic intervention of the p53 pathway in cancer. *Chem. Soc. Rev.* **49**, 6995–7014.
105. Dong X., Zhang Z., Zhao J., Lei J., Chen Y., Li X., Chen H., Tian J., Zhang D., Liu C., Liu C. (2016) The rational design of specific SOD1 inhibitors via copper coordination and their application in ROS signaling research. *Chem. Sci.* **7**, 6251–6262. <https://doi.org/10.1039/C6SC01272H>
106. Hammond E.M., Giaccia A.J. (2005) The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 718–725. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.154>
107. Ostrakhovitch E.A., Olsson P.-E., Jiang S., Cherian M.G. (2006) Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Lett.* **580**, 1235–1238. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.036>
108. Fan L.Z., Cherian M.G. (2002) Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *Br. J. Cancer.* **87**, 1019–1026. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600549>
109. Ostrakhovitch E.A., Song Y.P., Cherian M.G. (2016) Basal and copper-induced expression of metallothionein isoform 1, 2 and 3 genes in epithelial cancer cells: the role of tumor suppressor p53. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **35**, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.01.008>
110. Tan M., Li S., Swaroop M., Guan K., Oberley L.W., Sun Y. (1999) Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12061–12066. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.12061>
111. Liu D.S., Duong C.P., Haupt S., Montgomery K.G., House C.M., Azar W.J., Pearson H.B., Fisher O.M., Read M., Guerra G.R., Haupt Y. (2017) Inhibiting the system xC⁻/glutathione axis selectively targets cancers with mutant-p53 accumulation. *Nat. Commun.* **8**, 14844. <https://doi.org/10.1038/ncomms14844>

The p53 Tumor Suppressor and Copper Metabolism: an Unrevealed but Important Link

S. A. Tsymbal¹*, A. G. Refeld¹, and O. A. Kuchur¹

¹ChemBio Cluster, University of Informational Technology Mechanics and Optics (ITMO), Saint Petersburg, 197101 Russia

*e-mail: zymbal@scamt-itmo.ru

The balance of redox reactions and the fate of the tumor cell are closely related to the regulation of intracellular homeostasis of transition metals, among which copper and its compounds play an exceptional role. Elevated levels of intracellular copper may be a cause and/or consequence of malignancy, since the metabolism of this metal affects the functioning of the electron transport chain, transcription regulation, cell growth and migration. This wide range of actions is used in antitumor therapy: ROS generation and apoptosis mediated by copper addition, copper deprivation by chelators, and targeted inhibition of specific participants in the copper metabolism chain effectively reduce the survival of tumor cells. However, the exact mechanisms of influence on the cell cycle and cell death behind the activity of copper-associated drugs are still largely unexplored. Numerous attempts to identify them led to the identification of the induction of oxidative stress and the activation of apoptotic cascades via the p53 tumor suppressor, an integral attribute of the action of such compounds. At the same time, the influence of p53, apparently, also extends to the activity of copper metabolism proteins, mediating the processes of antioxidant protection and survival. More and more researches confirm that the interaction of copper and p53 is multifaceted and is not limited solely by ROS. The purpose of the review is to describe how p53 regulation is related to copper metabolic pathways and how this interaction can be used to improve the effectiveness of oncotherapy.

Keywords: copper metabolism, reactive oxygen species, p53, chemotherapy, Atox1, Ctr1, tumor therapy

СТАТУС МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ АПОПТОЗА И ИНТЕНСИВНОСТЬ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЛИЦ, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ОБЛУЧЕНИЮ© 2022 г. Е. А. Блинова^{a, b, *}, В. С. Никифоров^{a, b}, А. И. Котикова^{a, b},
М. А. Янишевская^a, А. В. Аклев^{a, b}^aУральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства,
Челябинск, 454048 Россия^bЧелябинский государственный университет, Челябинск, 454001 Россия

*e-mail: blinova@urcrm.ru

Поступила в редакцию 29.03.2022 г.

После доработки 13.04.2022 г.

Принята к публикации 13.05.2022 г.

Метилирование CpG-островков промоторных регионов генов – наиболее распространенная эпигенетическая модификация, принимающая участие в регуляции экспрессии генов. В ряде исследований показано, что ионизирующее излучение может вызывать как гипер- так и гипометилирование ДНК. Аберрантное метилирование влияет на реализацию клеточных процессов и может приводить к развитию различных патологических состояний. В литературе имеются единичные исследования статуса метилирования ДНК у человека в отдаленные сроки после радиационного воздействия. Проведен анализ уровня метилирования CpG-островков промоторных регионов генов апоптоза (*BCL2*, *ATM*, *MDM2*, *CDKN1A*, *STAT3*, *NFKB1*), а также его влияния на интенсивность апоптоза лимфоцитов периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. В исследовании приняли участие жители Южно-Уральского региона, подвергшиеся хроническому радиационному воздействию вследствие сбросов в 1949–1956 гг. радиоактивных отходов в реку Течу производственным объединением “Маяк”. Установлено, что среди облученных доля лиц с гиперметилированным промотором гена *BCL2* статистически значимо больше, чем в группе сравнения. Процент метилирования промоторного региона гена *ATM* слабо положительно коррелировал с дозовыми и возрастными характеристиками. Также установлены различия в частоте апоптоза лимфоцитов у облученных лиц с гипо- и гиперметилированными промоторами гена *ATM*. На основании полученных данных можно предполагать, что в отдаленном периоде после хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия в диапазоне малых и средних доз происходят эпигенетические модификации генома, выражающиеся в изменении метилирования промоторных регионов генов *BCL2* и *ATM*.

Ключевые слова: радиационное облучение, CpG-островки, гиперметилирование, *BCL2*, *ATM*, апоптоз лимфоцитов

DOI: 10.31857/S0026898422050032

ВВЕДЕНИЕ

Ионизирующее излучение (ИИ), помимо непосредственного повреждения генетического аппарата клетки, может вызывать эпигенетические нарушения, проявляющиеся в изменении статуса метилирования ДНК, модификации гистонов, модуляции экспрессии генов и микроРНК. Некоторые из этих альтераций митотически стабильны и могут

сохраняться в ряду клеточных поколений, приводя к развитию отдаленных эффектов ионизирующего излучения, таких как онкологические заболевания и возраст-ассоциированные заболевания [1].

Метилирование ДНК – наиболее распространенная эпигенетическая модификация, играющая важную роль в регуляции клеточных процессов, прежде всего экспрессии генов, и в развитии геномной нестабильности [2]. Наиболее широко изучено гиперметилирование промоторных областей, которое приводит к снижению транскрипционной активности гена или его полному вы-

Сокращения: ИИ – ионизирующее излучение; ЛПК – лимфоциты периферической крови; ККМ – красный костный мозг; мГр – миллигрей; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени.

ключению [3]. Кроме того, в последнее время все чаще встречается информация о глобальном гипометилировании как факторе развития онкогенеза [4]. Будучи достаточно лабильной системой, статус метилирования ДНК в значительной степени зависит от эндогенных факторов (например, аберрантная активность метилтрансфераз, нарушение работы систем репарации клетки) [5] и экзогенных факторов, в том числе радиационной природы. В ряде исследований показано, что ИИ опосредует стойкое изменение статуса метилирования ДНК в широком диапазоне доз [6–8].

Один из основных процессов, принимающих участие в реализации как ранних, так и отдаленных эффектов радиационного облучения, – апоптоз. Его активация начинается с изменения экспрессии генов, регулирующих процессы репарации повреждений ДНК, контроля клеточного цикла, пролиферации и дифференцировки клеток [9]. По мере реализации клеточной гибели включается генетическая программа, регулирующая баланс внутриклеточных про- и антиапоптотических факторов.

В физиологических условиях поддерживается строгое равновесие про- и антиапоптотических белков, однако после радиационного воздействия, а также при различных патологических состояниях происходит смещение этого равновесия, обусловленное изменением экспрессии генов, принимающих участие в апоптозе. Нарушение процесса апоптоза способствует развитию патологических состояний, которые могут сопровождаться сохранением в облученном организме клеток с неограниченным пролиферативным потенциалом или развитием цитопенических состояний, связанных с повышенной гибелью клеток.

В ранее проведенных нами исследованиях у хронически облученных жителей прибрежных сел реки Течи регистрировали изменения интенсивности апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови (ЛПК) в отдаленные сроки [10]. Кроме того, было показано изменение транскрипционной активности апоптотических генов, которое сопровождалось снижением относительного содержания мРНК белка BCL-2 и увеличением относительного содержания мРНК BAX у облученных лиц спустя более 60 лет после начала хронического радиационного воздействия [11].

Учитывая вышесказанное, мы исследовали уровни метилирования промоторных регионов генов апоптоза: *BCL2*, *ATM*, *MDM2*, *CDKN1A*, *STAT3*, *NFKB1*, – а также их влияние на интенсивность апоптоза ЛПК у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика обследованных лиц. Исследование уровня метилирования CpG-островков про-

моторных регионов генов *BCL2*, *ATM*, *MDM2*, *CDKN1A*, *STAT3*, *NFKB1* и апоптотической гибели лимфоцитов проводили у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию вследствие сбросов радиоактивных отходов в реку Течу в 1949–1956 гг. производственным объединением “Маяк” (ПО “Маяк”) [12].

В исследовании участвовало 145 жителей прибрежных сел реки Течи. Все обследуемые лица были разделены на две группы: группа сравнения, в которую вошло 65 человек с накопленной дозой облучения красного костного мозга (ККМ), не превышающий 70 мГр [13], и группа облученных (80 человек) с накопленными дозами в диапазоне от 80 до 3510 мГр (среднее значение – 790 ± 80 мГр). Накопленные дозы в тимусе и периферических лимфоидных органах в группе облученных находились в диапазоне от 3 до 640 мГр (среднее значение – 90 ± 10 мГр). У лиц из группы сравнения дозы облучения ККМ составляли от 1 до 63 мГр, а тимуса и периферических лимфоидных органов – от 0 до 30 мГр. Сравнимые группы были сопоставимыми по полу, возрасту и включали представителей двух этнических групп: славян и тюрков. Характеристика обследуемых групп представлена в табл. 1.

Апоптотическую гибель ЛПК анализировали у 89 человек двух групп, их подробная характеристика представлена в табл. 2.

Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на проведение исследования, одобренное этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России (Челябинск).

Оценка уровня метилирования промоторных регионов генов. Бисульфитная конверсия была выполнена с использованием набора реагентов EpiJET Bisulfite Conversion Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Эффективность конверсии оценивали по выходу и качеству ДНК, обработанной бисульфитом, с помощью набора для преобразования и количественного контроля бисульфита Cell-to-CpG™ Bisulfite Conversion and Quantitation Control Kit (“Thermo Fisher Scientific”). Методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием коммерческого набора праймеров Conversion Control Primer Mix (“Thermo Fisher Scientific”) определяли количество неконвертированной и конвертированной геномной ДНК. Качество конверсии и фрагментации ДНК анализировали электрофорезом в 2%-ном агарозном геле с использованием бромистого этидия в качестве красителя.

После обработки ДНК бисульфитом и определения эффективности конверсии проводили амплификацию с праймерами, специфичными для метилированных участков ДНК. Последователь-

Таблица 1. Характеристика участников исследования

| Характеристика группы | | Облученные лица | Группа сравнения |
|--|---------|------------------------------------|----------------------------------|
| Число участников | | 80 | 65 |
| Возраст, лет | | 71 ± 5.5 ^a (62–83) | 65 ± 6.7 ^a (54–79) |
| Пол | мужчины | 28 (35%) ^b | 21 (32%) ^b |
| | женщины | 52 (65%) | 44 (68%) |
| Этническая группа | славяне | 36 (45%) | 45 (69%) |
| | тюрки | 44 (55%) | 20 (31%) |
| Накопленные дозы облучения ККМ, мГр | | 790 ± 80 ^c (80–3510) | 20 ± 2 ^c (1–63) |
| Накопленные дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр | | 90 ± 10 ^c (3–640) | 7 ± 1 ^c (0–30) |

^a Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD), в скобках указаны минимальные и максимальные значения (min–max). ^b Данные представлены как число участников (процентное соотношение). ^c Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка (SE), (min–max).

Таблица 2. Характеристика участников исследования по апоптотической гибели ЛПК

| Характеристика группы | | Облученные лица (N = 49) | Группа сравнения (N = 40) |
|--|---------|---------------------------------------|---|
| Возраст на момент обследования, лет | | 70.98 ± 0.83 ^a (62–83) | 63.45 ± 1.02 ^a (56–79) |
| Пол | мужчины | 18 (36.7%) ^b | 14 (35%) ^b |
| | женщины | 31 (63.3%) | 26 (65%) |
| Этническая принадлежность | славяне | 18 (36.7%) | 29 (72.5%) |
| | тюрки | 31 (63.3%) | 11 (27.5%) |
| Накопленные дозы облучения ККМ, мГр | | 556 ± 106 ^a (77.7–3507) | 9.41 ± 2.63 ^a (1.30–56.1) |
| Накопленные дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр | | 59.4 ± 11 ^a (2.83–355) | 1.87 ± 1.61 ^a (0–33.6) |

^a Данные представлены как среднее ± SE, (min–max). ^b Данные представлены как число участников (процентное соотношение).

ности праймеров для ПЦР фрагментов промоторных регионов генов *ATM*, *BCL2*, *CDKN1A* были взяты из литературных данных [14–16]. Праймеры для промоторных регионов генов *MDM2*, *STAT3*, *NFKB1* сконструированы с использованием программы MethPrimer. Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой “ДНК-Синтез” (Россия). Характеристика праймеров представлена в табл. 3.

Статус метилирования последовательностей генов анализировали с использованием метилспецифической ПЦР. Использовали 5× реакционную смесь qPCRmix-HS (“Евроген”, Россия), состоящую из высокопроцессивной Taq ДНК-полимеразы со специфическими моноклональными антете-

лами, красителем SYBR Green I, смеси dNTP, Mg²⁺ и ПЦР-буфера. Состав ПЦР-смеси для амплификации фрагментов ДНК представлен в табл. 4. ПЦР-РВ проводили с использованием амплификатора StepOnePlus Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, США).

В качестве контролей для оценки метилирования исследуемых CpG-островков промоторных регионов генов использовали подвергнутые бисульфитной конверсии образцы коммерческой полностью метилированной ДНК CpG Methylated Human Genomic DNA (“Thermo Fisher Scientific”) и неметилированной ДНК (Human Genomic DNA: Male). Контроли смешивали в следующем соотношении: 0/100, 2/98, 5/95, 10/90, 25/75,

Таблица 3. Используемые в работе олигонуклеотиды

| Ген | Тип праймера | Последовательность (5'→3') ^a | T_m^b , °C | Длина ампликона, п.н. |
|---------------|---------------------|--|--------------|-----------------------|
| <i>BCL2</i> | Meth ^c | F: GTTTT TAGCGTTCGGTATCGG R: AAATCTCTATCCACGAAACCGC | 60 | 192 |
| | Unmeth ^d | F: GGGTTTTAGTGTGGTATTGG R: AAATCTCTATCCACAAAACCACTTC | 59 | 194 |
| <i>ATM</i> | Meth | F: GGAGTTCGAGTCGAAGGGC R: CTACCTACTCCCGCTTCCGA | 59 | 239 |
| | Unmeth | F: GTTTTGGAGTTTGAGTTGAAGGGT R: AACTACCTACTCCCACTTCCAA | 56 | 246 |
| <i>CDKN1A</i> | Meth | F: GTCGAAGTTAGTTTTTTGTGGAGTC R: CGAAATCCCCTATTATCTACGC | 65 | 230 |
| | Unmeth | F: TTGAAGTTAGTTTTTTGTGGAGTTG R: CCAAAATCCCCTATTATCTACCAC | 66 | 230 |
| <i>MDM2</i> | Meth | F: TTTGTCGGGTTATTAGTGTGAAC R: CCTTTTACTACAATTTTCGAAACGTA | 58 | 129 |
| | Unmeth | F: TTGTTGGGTTATTAGTGTGAATGT R: CCTTTTACTACAATTTCAAACATA | 56 | 130 |
| <i>STAT3</i> | Meth | F: TAGTCGAGGGAATAAGTTTTAATCG R: GAAAAACCGAAACTACGCGT | 61 | 156 |
| | Unmeth | F: AGTTGAGGGAATAAGTTTTAATTGG R: AAACCAAAAAACCAAACTACACAT | 59 | 162 |
| <i>NFKB1</i> | Meth | F: TTAGTTAGGAAGTGAGAGAGTGAGC R: GAAAAAAACAAAAAAACAATCAACG | 60 | 189 |
| | Unmeth | F: TTTAGTTAGGAAGTGAGAGAGTGAGTG R: CAAAAAAACAAAAAAACTATCAACA | 61 | 193 |

^a F – прямой праймер, R – обратный праймер; ^b температура плавления; ^c метилированный праймер; ^d неметилированный праймер.

50/50, 75/25 и 100/0. Уровни метилирования для каждого контрольного образца составили 0, 2, 5, 10, 25, 50, 75 и 100% соответственно.

Результаты метилирования анализировали с использованием программного обеспечения HRM Software. Уровень метилирования промоторных регионов, превышающий 50%, рассматривали как гиперметилирование, а в диапазоне от 0 до 10% – как гипометилирование.

Оценка апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови. Анализ проводили методом TUNEL (TdUTP Nick End Labeling – концевое мечение dUTP при помощи терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы). У пациентов клиники УНПЦ РМ венозную кровь собирали в вакуумную пробирку (объем 9 мл) с антикоагулянтом (гепарин). Лейкоцитарную фракцию выделяли в градиенте плотности Lymphoprep (“STEMCELL Technologies”, Норвегия) согласно инструкции производителя. Затем проводили пермобилизацию клеток и фиксировали с использованием

охлажденного 70%-ного этилового спирта. Позднюю апоптотическую гибель ЛПК оценивали с использованием набора APO DIRECT™ Kit (“BD”, США) на проточном цитофлуориметре Navios (“Beckman Coulter”, США) путем мечения разрывов ДНК с помощью FITC-dUTP [17].

Статистический анализ данных. Для анализа нормальности распределения количественных показателей использовали критерий Колмогорова–Смирнова. При описании выборок данных, подчиняющихся законам нормального распределения, использовали среднее арифметическое значение (M) с указанием ошибки среднего ($\pm SE$) и диапазона значений (min–max). При описании выборок, распределение частот в которых отличалось от нормального, использовали медиану (Me) и 25–75 процентиля (Q1–Q3).

Выборки данных сравнивали с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. Сравнение частот выявленных случаев метилирования в исследуемых группах проводили с помощью точного кри-

Таблица 4. Условия проведения ПЦР в реальном времени

| Ген | Условия ПЦР-РВ | Число циклов | Объем компонентов ПЦР-смеси, мкл |
|---------------|------------------------|--------------|--|
| <i>BCL2</i> | 95°C 5 мин | 1 | qPCRMix-HS SYBR – 5 Прямой праймер – 1.5 Обратный праймер – 1.5 dH ₂ O – 16 ДНК-матрица – 1 |
| | 95°C 30 с | 40 | |
| | 60°C 30 с 72°C 30 с | | |
| <i>ATM</i> | 95°C 5 мин | 1 | |
| | 95°C 30 с | 40 | |
| | 58°C 30 с 72°C 30 с | | |
| <i>CDKN1A</i> | 95°C 5 мин | 1 | |
| | 95°C 30 с | 40 | |
| | 66°C 30 с 72°C 30 с | | |
| <i>MDM2</i> | 95°C 5 мин | 1 | |
| | 95°C 30 с | 40 | |
| | 58°C 30 с 72°C 30 с | | |
| <i>STAT3</i> | 95°C 5 мин | 1 | |
| | 95°C 30 с | 40 | |
| | 60°C 30 с 72°C 30 с | | |
| <i>NFKB1</i> | 95°C 5 мин | 1 | |
| | 95°C 30 с | 40 | |
| | 61°C 30 с 72°C 30 с | | |

терия Фишера. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

С целью оценки влияния накопленной дозы излучения и возраста на исследуемые показатели проводили корреляционный анализ. Коэффициенты ранговой корреляции (R) рассчитывали по Спирмену, статистически значимыми считали корреляции при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование метилирования CpG-островков промоторных регионов генов

Распределение участников, обследованных по уровню метилирования CpG-островков промоторных областей генов *BCL2*, *ATM*, *CDKN1A*, *MDM2*, *STAT3*, *NFKB1*, представлено на рис. 1.

В связи с тем, что некоторые подгруппы по показателю уровня метилирования были малочисленными, для оценки частот выявленных случаев метилирования были сформированы две подгруппы в каждой обследованной группе: в первую вошли участники с уровнем метилирования CpG-островков промоторов исследуемых генов от 0 до

10%, во вторую – от 10 до 100%. В табл. 5 представлены данные по уровню метилирования CpG-островков промоторов генов *BCL2*, *CDKN1A*, *ATM*, *MDM2*, *STAT3* и *NFKB1* в ЛПК у участников исследования.

Доля выявленных лиц с повышенным уровнем метилирования (более 10%) CpG-островков промоторного гена *BCL2* в группе облученных была статистически значимо выше, чем в группе сравнения ($p = 0.002$, OR = 8.5, 95% CI = 1.9–38.6). Для остальных промоторных регионов исследуемых генов статистически значимых различий не обнаружено (табл. 5). Более чем у 90% членов группы сравнения регистрировали гипометилирование промоторной области гена *BCL2* (уровень метилирования варьировал от 0 до 10%), в то время как в группе облученных гипометилирование регистрировали у 75% обследованных, а гиперметилирование (уровень метилирования >50%) – у 18% (рис. 1). Кроме того, у большинства участников из группы сравнения (87% обследованных) уровень метилирования промоторного региона гена *ATM* составил от 0 до 10%, а в группе облученных – у 77%. У большинства участников ис-

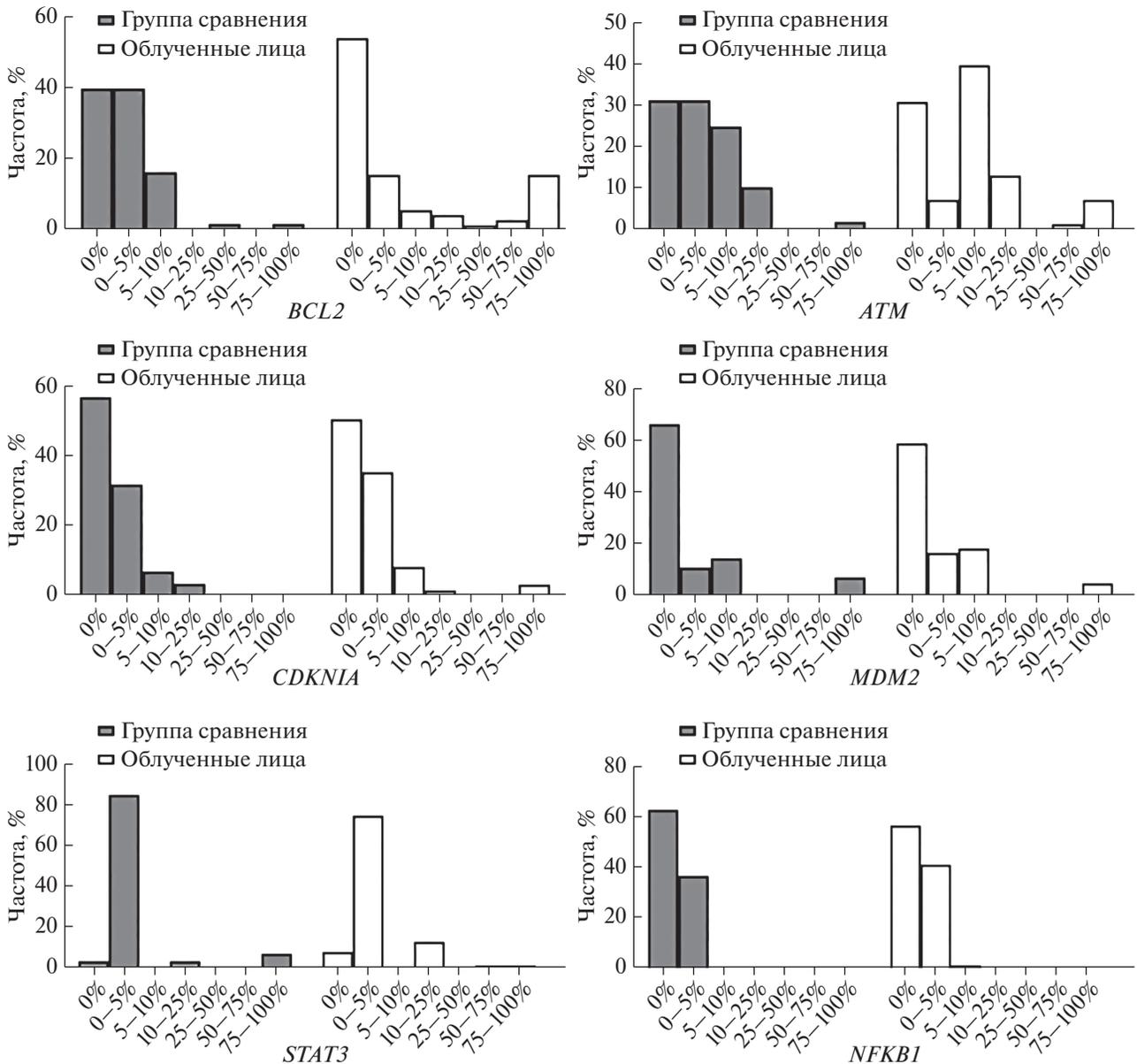


Рис. 1. Распределение участников исследования по уровню метилирования промоторов генов *BCL2*, *ATM*, *CDKN1A*, *MDM2*, *STAT3*, *NFKB1*. По оси абсцисс отложен процент метилированных CpG-островков в промоторных участках генов; по оси ординат – частота встречаемости среди обследованных лиц.

следования, как в группе облученных, так и сравнения, уровень метилирования промоторных регионов генов *CDKN1A*, *MDM2* и *STAT3* не превышал 5%, а для гена *NFKB1* гиперметилирование промоторной области не обнаружено вообще (рис. 1).

На уровень метилирования ДНК могут влиять различные факторы, как радиационной, так и нерadiационной природы. Так, известно о возраст-зависимом изменении метилирования ДНК [18]. Учитывая это, мы провели корреляционный анализ зависимости уровня метилирования от дозы облучения ККМ, тимуса и периферических лим-

фоидных органов, а также возраста на момент обследования. Результаты представлены в табл. 6.

В результате корреляционного анализа установлено, что процент метилирования промоторного региона гена *ATM* слабо положительно коррелирует с дозой облучения ККМ ($R = 0.2, p = 0.03$), тимуса и периферических лимфоидных органов ($R = 0.24, p = 0.008$), а также с возрастом на момент обследования ($R = 0.3, p = 0.001$). Метилирование промоторного региона гена *BCL2* слабо положительно коррелирует с возрастом на момент обследования ($R = 0.23, p = 0.001$). Для остальных генов

Таблица 5. Уровни метилирования CpG-островков промоторных регионов исследованных генов у хронически облученных лиц и в группе сравнения

| Ген | Частота встречаемости, число (%) | | | | OR (95% CI) ^b | p-value ^c |
|---------------|----------------------------------|-----------|------------------|----------|-----------------------------|----------------------|
| | облученные лица | | группа сравнения | | | |
| | 0–10% ^a | 10–100% | 0–10% | 10–100% | | |
| <i>BCL2</i> | 53 (75.7) | 17 (24.3) | 53 (96.4) | 2 (3.6) | 8.5 (1.9–38.6) | 0.002 |
| <i>ATM</i> | 53 (78.0) | 15 (22.0) | 42 (87.6) | 6 (12.4) | 1.9 (0.7–5.5) | 0.2 |
| <i>CDKN1A</i> | 56 (94.9) | 3 (5.1) | 27 (96.3) | 1 (3.7) | 1.4 (0.1–14.6) | 1.0 |
| <i>MDM2</i> | 56 (94.8) | 3 (5.2) | 25 (92.6) | 2 (7.4) | 0.7 (0.1–4.3) | 0.6 |
| <i>STAT3</i> | 50 (83.3) | 10 (16.7) | 24 (88.9) | 3 (11.1) | 1.6 (0.4–6.3) | 0.7 |
| <i>NFKB1</i> | 59 (100) | 0 | 27 (100) | 0 | – | – |

^a Процент метилирования CpG-островков в промоторных областях; ^b отношение шансов (95%-ный доверительный интервал); ^c двусторонний точечный тест Фишера.

Таблица 6. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (R) процента метилирования промоторных регионов исследуемых генов от доз облучения, накопленных в ККМ, тимусе и периферических лимфоидных органах, а также от возраста пациента на момент исследования

| Ген | R (p) ^a | | |
|---------------|--|---|---------------------------------|
| | Доза облучения ККМ, 1– 510 мГр ^b | Доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, 0–640 мГр ^b | Возраст, 54–83 лет ^b |
| <i>MDM2</i> | 0.02 (0.9) | –0.01 (0.9) | 0.09 (0.4) |
| <i>BCL2</i> | 0.04 (0.6) | 0.08 (0.3) | 0.23 (0.01) |
| <i>ATM</i> | 0.2 (0.03) | 0.24 (0.008) | 0.3 (0.001) |
| <i>CDKN1A</i> | 0.15 (0.1) | 0.09 (0.4) | 0.17 (0.1) |
| <i>STAT3</i> | 0.05 (0.6) | –0.08 (0.4) | 0.09 (0.4) |
| <i>STAT3</i> | 0.04 (0.7) | 0.48 (0.6) | –0.08 (0.4) |
| <i>NFKB1</i> | 0.07 (0.5) | 0.03 (0.9) | 0.2 (0.1) |

^a Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (уровень значимости); ^b диапазон минимальных и максимальных значений.

статистически значимых связей с исследуемыми показателями не выявлено.

Интенсивность апоптотической гибели лимфоцитов при разных уровнях метилирования промоторных областей генов

Уровень метилирования промоторных регионов влияет на транскрипционную активность регулируемых ими генов. Так, гипометилирование способствует активации транскрипции, а гиперметилирование – ее репрессии. Это отражается на уровнях экспрессии соответствующих белков и, следовательно, на регуляции клеточных процессов, в том числе апоптоза. Нами проведено сравнение уровней апоптотической гибели ЛПК облученных пациентов, имеющих разный уровень метилирования промоторных регионов генов *BCL2* и *ATM*. В табл. 7 представлены медианные значения пока-

зателей апоптоза в группе облученных, а также в объединенной группе, состоящей из облученных и необлученных участников исследования.

В результате исследования у облученных лиц с уровнем метилирования промоторного участка гена *ATM* от 10 до 100% обнаружено снижение частоты апоптотической гибели ЛПК – в отличие от лиц с гипометилированием этого участка (от 0 до 10%). Снижение уровня апоптоза ЛПК выявлено и в объединенной группе с гиперметилированием (рис. 2).

При исследовании уровня апоптоза в зависимости от степени метилирования промоторного региона *BCL2* не обнаружено статистически значимых различий в интенсивности апоптотической гибели ЛПК, как в группе облученных, так и в объединенной (табл. 7).

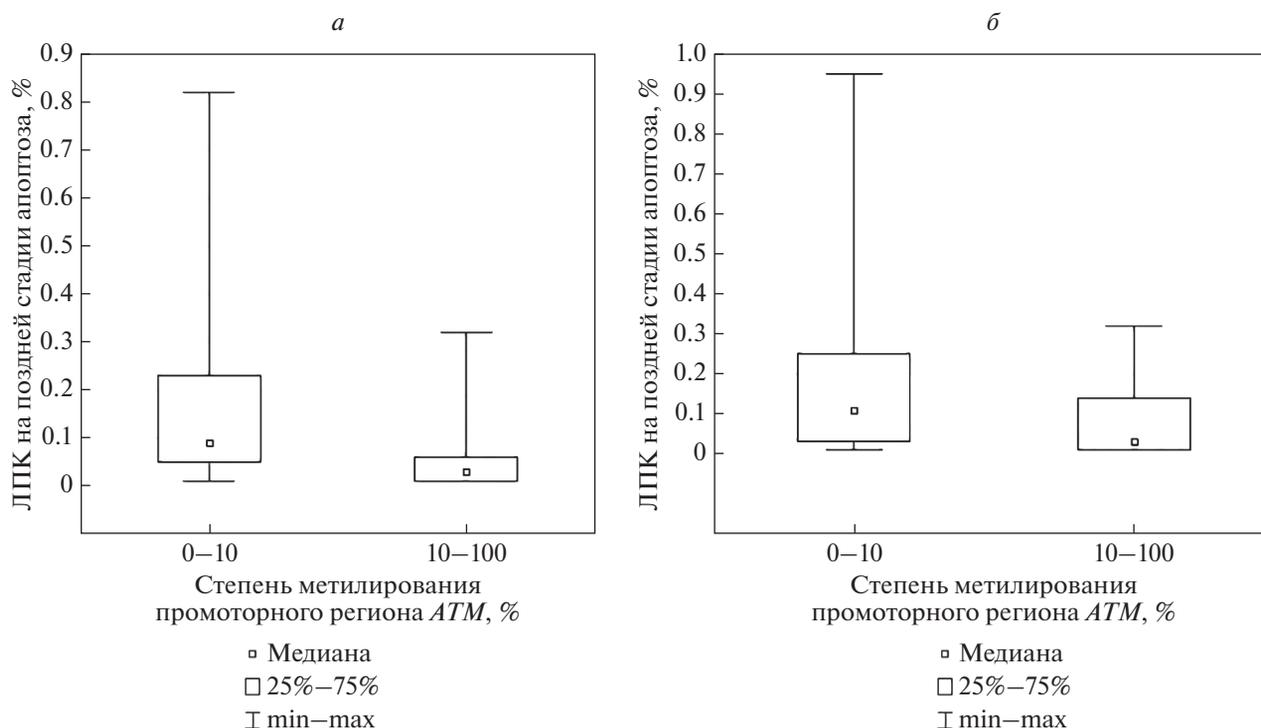


Рис. 2. Уровень поздней апоптотической гибели ЛПК у лиц с гипо- и гиперметилированием промоторного региона гена *ATM* в группе облученных (*а*) и в объединенной группе участников (*б*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Один из важнейших механизмов регуляции экспрессии генов – метилирование ДНК. Аберрантное метилирование может приводить к нестабильности генома, неконтролируемому делению клеток и развитию различных патологических состояний [19]. Известно, что ИИ, будучи генотоксическим агентом, способствует как гипер-, так и гипометилированию ДНК. В большинстве исследований *in vitro* и *in vivo* показано,

что в ранние сроки после облучения (часы, сутки) эпигенетический статус генома изменяется достаточно динамично [20]; при этом имеются лишь единичные исследования статуса метилирования ДНК человека в отдаленные сроки после радиационного воздействия. Так, в лейкоцитах крови ликвидаторов аварии на Чернобыльской атомной электростанции (АЭС) и работников других АЭС, в отдаленном периоде после радиационного воздействия, было выявлено гиперме-

Таблица 7. Уровень апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови при различных уровнях метилирования промоторных регионов генов *BCL2* и *ATM*

| Группа | Параметр | Уровень метилирования промоторной области | | | |
|---------------------|--------------------------|---|---------------------|---------------------|----------------------------------|
| | | <i>BCL2</i> | | <i>ATM</i> | |
| | | 0–10% | 10–100% | 0–10% | 10–100% |
| Облученные | <i>N</i> ^а | 28 | 9 | 26 | 8 |
| | Апоптоз ^б , % | 0.09 (0.04–0.26) | 0.06 (0.01–0.21) | 0.09 (0.05–0.25) | 0.03 ^с (0.01–0.10) |
| Объединенная группа | <i>N</i> ^а | 64 | 12 | 59 | 11 |
| | Апоптоз ^б , % | 0.09 (0.03–0.26) | 0.06 (0.01–0.19) | 0.11 (0.03–0.25) | 0.03 ^с (0.01–0.14) |

^а Число участников; ^б уровень апоптоза представлен как Ме (Q1–Q3); ^с *p* = 0.03 (уровень значимости различий уровня поздней стадии апоптоза между облученными лицами с гипо- и гиперметилированием промоторной области гена *ATM*).

тирование CpG-островков в промоторах генов *INK4A* (рамка считывания белка p16) и *GSTP1* [21]. Кроме того, среди работников реакторного производства ПО “Маяк”, подвергшихся длительному внешнему воздействию γ -излучения и сочетанному внешнему и внутреннему облучению, доля лиц с гиперметилованием CpG-островков в промоторах генов *GSTP1*, *TP53* и *SOD2* была статистически значимо выше, чем в контрольной группе [22]. При исследовании уровня метилирования геномной ДНК у врачей-рентгенологов, подвергшихся облучению в диапазоне малых доз (20 мЗв в год или 100 мЗв за 5 лет), был выявлен пониженный уровень метилирования повторов LINE-1 по сравнению с контрольной группой [23].

В проведенном нами исследовании установлено, что в группе облученных пациентов доля лиц с повышенным уровнем метилирования CpG-островков в промоторе гена *BCL2* была статистически значимо выше, чем в группе сравнения. Стоит отметить, что в проведенных ранее исследованиях качественного анализа уровня метилирования ДНК в промоторных регионах нескольких генов мы не обнаружили в группе пациентов с дозой облучения ККМ в диапазоне от 0.08 до 0.9 Гр статистически значимого увеличения доли лиц с метилированными CpG-островками в промоторной области гена *BCL2* [24]. В тоже время, было выявлено, что уровень метилирования промоторного региона гена *ATM* слабо положительно коррелирует с дозами облучения ККМ, тимуса и лимфоидных органов. Пока нет сообщений об изменении статуса метилирования гена *ATM* при хроническом радиационном воздействии, хотя М. Li и соавт. [25] выявили линейную зависимость снижения экспрессии гена *ATM* от дозы облучения в условиях хронического радиационного воздействия. Это косвенное доказательство в пользу эффекта гиперметилования регуляторной области гена *ATM* в отдаленном периоде после радиационного воздействия.

Также нами показано, что метилирование промоторных регионов генов *BCL2* и *ATM* положительно коррелирует с возрастом на момент обследования.

Гиперметилование CpG-островков промоторных областей приводит к подавлению инициации транскрипции с контролируемых ими генов, что в конечном счете отражается на уровне кодируемого белка и регуляции клеточных процессов. Нами показано, что у облученных лиц с уровнем метилирования промоторного участка гена *ATM* в диапазоне от 10 до 100% апоптотическая гибель ЛПК происходит реже, чем при гипометилировании этого участка. Продукт гена *ATM* – серин/треониновая протеинкиназа – активируется двухцепочечными разрывами ДНК и фосфорилирует белки, регулирующие клеточный

цикл и апоптоз, в частности рекрутирует Chk2 и фосфорилирует MDM2 и p53 [26]. Вероятно, гиперметилование промоторного участка *ATM* приводит к снижению транскрипционной активности этого гена, уровня кодируемого белка и к нарушению механизмов передачи сигнала от повреждений, что, в свою очередь, активирует апоптотическую гибель лимфоцитов. Например, при гипофункции гена *Atm* у мышей (*Atm-null*) регистрируют повышенный уровень соматических мутаций и нарушения при прохождении клеточного цикла в контрольных точках фаз G1, S и G2 [27].

При исследовании частоты апоптоза в зависимости от уровня метилирования CpG-островков промоторного региона гена антиапоптотического белка *BCL-2* статистически значимых различий как в группе облученных лиц, так и в объединенной с группой сравнения выборке не выявлено. Белок *BCL-2* подавляет апоптотическую гибель клеток за счет контроля проницаемости митохондриальной мембраны, предотвращает выход цитохрома *c*, что, в свою очередь, ингибирует эффекторные каспазы [28]. Гиперметилование промоторной области *BCL2* может подавлять транскрипционную активность этого гена и, как следствие, активировать апоптотическую гибель клеток. Несмотря на то, что сейчас нами не обнаружена прямая связь степени метилирования промоторной области *BCL2* с уровнем апоптоза, ранее мы сообщали о повышении апоптотической гибели ЛПК у облученных лиц [10]. Стоит отметить, что на данном этапе, из-за малочисленности выборок, нельзя сделать окончательных выводов о влиянии метилирования промоторных регионов генов *BCL2* и *ATM* на апоптоз. В связи с этим результаты исследования уровня апоптоза ЛПК в зависимости от степени метилирования CpG-островков промоторных регионов *BCL2* и *ATM* можно считать предварительными, для их уточнения необходимы дальнейшие исследования на расширенной выборке.

Таким образом, в рамках проведенного исследования у облученных лиц в отдаленном периоде после хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия в диапазоне малых и средних доз наблюдаются эпигенетические модификации генома, выражающиеся в изменении метилирования промоторных регионов генов, регулирующих апоптоз и клеточный цикл: *BCL2* и *ATM*.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. В группе облученных доля лиц с уровнем метилирования более 10% CpG-островков промоторного региона гена *BCL2* была статистически значимо выше, чем в группе сравнения ($p = 0.002$, OR = 8.5, 95% CI 1.9–38.6). Следовательно, можно говорить о гиперметилировании этого гена в

отдаленном периоде после хронического радиационного воздействия.

2. Метилирование промоторного региона гена *ATM* слабо положительно коррелировало с дозой облучения, накопленной в ККМ, тимусе и периферических лимфоидных органах, а также с возрастом на момент обследования.

3. У облученных пациентов с гиперметилированным промотором гена *ATM* апоптотическую гибель ЛПК регистрировали чаще, чем у членов той же группы с гипометилированием этой области генома.

Работа проведена при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России (Государственный контракт № 27.501.21.2 от 11 июня 2021 года).

Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России в соответствии с Хельсинской декларацией 1964 года.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ilnytskyi Y., Kovalchuk O. (2000) Non-targeted radiation effects-an epigenetic connection. *Mutat. Res.* **714**, 113–125.
2. Spainhour J.C., Lim H.S., Yi S.V., Qiu P. (2019) Correlation patterns between DNA methylation and gene expression in the cancer genome atlas. *Cancer Inform.* **18**, 1176935119828776.
3. Greenberg M.V.C., Bourc'his D. (2019) The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 590–607.
4. Van Tongelen A., Lorient A., De Smet C. (2017) Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett.* **28**(396), 130–137.
5. Edwards J.R., Yarychivska O., Boulard M., Bestor T.H. (2017) DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin.* **10**, 23.
6. Antwi D.A., Gabbara K.M., Lancaster W.D., Ruden D.M., Zielske S.P. (2013) Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways. *Epigenetics.* **8**(8), 839–848.
7. Bae, J.H., Kim J.G., Heo K., Yang K., Kim T.O., Yi J.M. (2015) Identification of radiation-induced aberrant hypomethylation in coloncancer. *BMC Genomics.* **16**(56), 12.
8. Lahtz C., Bates S.E., Jiang Y., Li A.X., Wu X., Hahn M.A., Pfeifer G.P. (2012) Gamma irradiation does not induce detectable changes in DNA methylation directly following exposure of human cells. *PLoS One.* **7**(9), e44858.
9. Verheij M., Bartelink H. (2000) Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res.* **301**, 133–142.
10. Блинова Е.А., Котикова А.И., Янишевская М.А., Аклеев А.В. (2020) Апоптоз лимфоцитов и полиморфизм генов регуляции апоптоза у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* **65**(4), 36–42.
11. Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. (2020) Транскрипционная активность генов клеточного цикла и апоптоза у хронически облученных лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутантных лимфоцитов. *Радиация и риск.* **29**(2), 89–100.
12. (2016) *Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи.* Под ред. Аклеева А.В. Челябинск: ФМБА, Уральский научно-практический центр радиационной медицины. 390 с.
13. (2009) *Государственные санитарно-эпидемиологические правила и нормативы.* СанПиН 2.6.1.2523-09. Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009). Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 100 с.
14. Begam N., Jamil K., Raju S.G. (2017) Promoter hypermethylation of the *ATM* gene as a novel biomarker for breast cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **18**(11), 3003–3009.
15. Watanabe M., Nakahata S., Hamasaki M., Saito Y., Kawano Y., Hidaka T., Yamashita K., Umeki K., Taki T., Taniwaki M., Okayama A., Morishita K. (2010) Downregulation of *CDKN1A* in adult T-cell leukemia/lymphoma despite overexpression of *CDKN1A* in human T-lymphotropic virus 1-infected cell lines. *J. Virol.* **84**(14), 6966–6977.
16. Li L.C., Dahiya R. (2002) MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* **18**(11), 1427–1431.
17. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C. (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods.* **243**(1–2), 167–190.
18. Salameh Y., Bejaoui Y., El Hajj N. (2020) DNA methylation biomarkers in aging and age-related diseases. *Front. Genet.* **11**, 171.
19. Kulis M., Esteller M. (2010) DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.* **70**, 27–56.
20. Jaenisch R. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33**, 245–254.
21. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.B. (2016) Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. *Environ. Res.* **146**, 10–17.
22. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В. (2017) Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. *Радиационная биология. Радиоэкология.* **57**(4), 341–356.
23. Cho Y.H., Jang Y., Woo H.D., Kim Y.J., Kim S.Y., Christensen S., Cole E., Choi S.Y., Chung H.W. (2018) LINE-1 hypomethylation is associated with radiation-induced genomic instability in industrial radiographers. *Environ. Mol. Mutagen.* **60**(2), 174–184.

24. Блинова Е.А., Никифоров В.С., Янишевская М.А., Аклеев А.В. (2021) Метилирование генов *BCL-2*, *CDKN1A* и *ATM* у лиц, подвергшихся хроническому облучению. *Медицина экстремальных ситуаций*. **23**(3), 11–15.
25. Li M.J., Wang W.W., Chen S.W., Shen Q., Min R. (2011) Radiation dose effect of DNA repair-related gene expression in mouse white blood cells. *Med. Sci. Monit.* **17**, 290–297.
26. Hoekstra M.F. (1997) Responses to DNA damage and regulation of cell cycle checkpoints by the ATM protein kinase family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 170–175.
27. Rotman G. (1999) ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*. **18**, 6135–6144.
28. Knight T., Luedtke D., Edwards H., Taub J.W., Ge Y. (2019) A delicate balance – the BCL-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* **162**, 250–261.

METHYLATION STATUS OF APOPTOSE GENES AND INTENSITY OF APOPTOTIC DEATH OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PERSONS CHRONICALLY EXPOSED TO RADIATION

E. A. Blinova^{1, 2, *}, V. S. Nikiforov^{1, 2}, A. I. Kotikova^{1, 2},
M. A. Yanishevskaya¹, and A. V. Akleyev^{1, 2}

¹ *Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, 454048 Russia*

² *Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, 454001 Russia*

*e-mail: blinova@urcrm.ru

Methylation of the CpG-islands of gene promoter regions is the most common epigenetic modification involved in the regulation of gene expression. A number of studies has shown that ionizing radiation can cause both hyper- and hypomethylation of DNA. Aberrant methylation affects cellular processes and can lead to the development of various pathological states. In the literature, there are single studies on methylation status of human DNA in a long time after radiation exposure. Here, methylation level of CpG-islands of promoter regions of the apoptosis genes (*BCL2*, *ATM*, *MDM2*, *CDKN1A*, *STAT3*, *NFKB1*), and also its influence on apoptosis of peripheral blood lymphocytes in chronically exposed persons were studied. The residents of the South Ural region who were chronically exposed to radistion (after discharges of radioactive wastes into the Techa river by the “Mayak Production Association” in 1949–1956) were included in the study. It was established that the proportion of individuals with hypermethylated *BCL2* gene promoter among the exposed people was statistically significantly higher than in the control group. The percentage of methylation of the *ATM* gene promoter weakly positively correlated with dose and age characteristics. Differences in the frequency of lymphocyte apoptosis in exposed individuals with hypo- and hypermethylated *ATM* gene promoter were also established. The data obtained indicate that in the long-term period after chronic low dose-rate radiation exposure in the range of low and medium doses epigenetic modifications of the genome occur, which are manifested as changes in methylation of promoter regions of *BCL2* and *ATM* genes.

Keywords: radiation exposure, CpG-islands, hypermethylation, *BCL2* gene, *ATM* gene, lymphocyte apoptosis

**ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА**

УДК 577

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА,
ГОМОЛОГИЧНОГО КРИПТОХРОМУ DASH, ИЗ АНТАРКТИЧЕСКИХ
ДИАТОМЕЙ *Phaeodactylum tricorutum* ICE-H[#]**© 2022 г. М. Л. An^{a, *}, J. L. Miao^{b, c, d, e, **}^a Rizhao Polytechnic, Department of Marine Technology, Shandong, Rizhao, 276826 China^b First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resource, Shandong, Qingdao, 266061 China^c Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, 266237 China^d Qingdao Key Laboratory of Marine Natural Products Research and Development, Qingdao, 266237 China^e Guangxi Academy of Sciences, Nanning, 530007 China

*e-mail: rubyhawthorn@163.com

**e-mail: miaojinlai@fio.org.cn

Поступила в редакцию 21.04.2022 г.

После доработки 01.07.2022 г.

Принята к публикации 05.07.2022 г.

Криптохромы типа DASH (cгу-DASH) относятся к семейству криптохромов/фотолиаз (CPF), которое включает фотолиазы, способные восстанавливать повреждения ДНК, вызванные ультрафиолетовым излучением, и криптохромы, действующие как фоторецепторы без фоторепарационной активности. Однако недавно показано, что cгу-DASH может восстанавливать циклобутанпиримидиновые димеры (CPDs) в поврежденной одноцепочечной ДНК (оцДНК). До настоящего времени криптохромы исследовали у прокариот и эукариот, в то время как особенности и роль cгу-DASH антарктических диатомей не анализировали. В представленной работе последовательность мРНК cгу-DASH антарктического диатомового растения *Phaeodactylum tricorutum* ICE-H (Pticгу-DASH) была извлечена из данных транскриптома этой водоросли, амплифицирована с помощью ОТ-ПЦР, клонирована, а затем экспрессирована в *Escherichia coli*. Филогенетический анализ показал, что последовательность Pticгу-DASH наиболее близка cгу-DASH. Экспрессия гена, кодирующего Pticгу-DASH, в условиях абиотического стресса исследована методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Значительное накопление транскриптов выявлено после воздействия ультрафиолетового излучения синего света, высокоинтенсивного излучения и высокой температуры. После экспрессии в *E. coli* белок Pticгу-DASH выделили, очистили и оценили его активность. Эксперименты по фотореактивации подтвердили, что Pticгу-DASH может восстанавливать CPDs в повреждениях оцДНК. Таким образом, впервые cгу-DASH идентифицирован в антарктической диатомовой водоросли. Свойства и особенности Pticгу-DASH, включая ультрафиолет-индуцированную функцию восстановления CPDs, могут способствовать эксплуатации ресурсов Антарктики.

Ключевые слова: *Phaeodactylum tricorutum*, криптохром DASH, Pticгу-DASH, повреждение ДНК, фоторецептор

DOI: 10.31857/S0026898422060027

[#] Статья представлена авторами на английском языке.

GENETIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A DASH CRYPTOCHROME HOMOLOGOUS GENE FROM ANTARCTIC DIATOM *Phaeodactylum tricornutum* ICE-H

M. L. An^{1, *} and J. L. Miao^{2, 3, 4, 5, **}

¹ Rizhao Polytechnic, Department of Marine Technology, Shandong, Rizhao, 276826 China

² First Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resource, Shandong, Qingdao, 266061 China

³ Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, 266237 China

⁴ Qingdao Key Laboratory of Marine Natural Products Research and Development, Qingdao, 266237 China

⁵ Guangxi Academy of Sciences, Nanning, 530007 China

*e-mail: rubyhawthorn@163.com

**e-mail: miaojinlai@fio.org.cn

DASH-type cryptochromes (cry-DASH) belong to cryptochrome/photolyase family (CPF) that includes photolyases with the capability to repair UVB-induced DNA lesions and cryptochromes acting as photoreceptors without photorepair activity. However, recent studies demonstrated that cry-DASH can repair cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) in damaged ssDNA. Up to now, cry-DASHs have been investigated in prokaryotes and eukaryotes. However, the characteristics and role of cry-DASH in Antarctic diatom were not elucidated. Here, a cry-DASH mRNA sequence (Ptcry-DASH) of the Antarctic diatom *Phaeodactylum tricornutum* ICE-H was retrieved from the transcriptome data, amplified by RT-PCR, cloned, and then expressed in *Escherichia coli*. The phylogenetic analysis indicated that Ptcry-DASH is most closely related to cry-DASH. The expression of the gene encoding Ptcry-DASH under abiotic stress was investigated by qRT-PCR. Significant transcript accumulation was revealed after exposure to UVB, blue light, high-intensity light, and high temperature. The Ptcry-DASH was expressed in *E. coli*, purified and its activity was measured. Photo-reactivation experiments confirmed that Ptcry-DASH can repair CPDs in ssDNA lesions. Taken together, for the first time the cry-DASH has been identified in the Antarctic diatom. The properties and peculiarities of Ptcry-DASH including UVB-induced CPDs repair function may promote the exploitation of Antarctic resources.

Keywords: *Phaeodactylum tricornutum*, DASH cryptochrome, Ptcry-DASH, DNA damage, photoreceptor

УДК 577.352.3.012

МЕХАНИЗМ ВЫЗВАННОГО МЕЛИТТИНОМ ПОДТЕКАНИЯ ФОСФАТИДИЛСЕРИН-СОДЕРЖАЩИХ МЕМБРАН[#]

© 2022 г. R. Wang^{a, b}, M.-Y. Shi^a, B.-B. Ma^{a, b}, J. Sheng^{a, b, *}^a*Xinjiang Laboratory of Phase Transitions and Microstructures of Condensed Matter Physics, College of Physical Science and Technology, Yili Normal University, Yining, 835000 China*^b*Key Laboratory of Micro-nano Electric Sensing Technology and Bionic Devices, Yili Normal University, Yining, 835000 China*

*e-mail: 2235835064@qq.com

Поступила в редакцию 06.04.2022 г.

После доработки 25.04.2022 г.

Принята к публикации 03.05.2022 г.

Фосфатидилсерин (PS) – важная сигнальная молекула апоптотических клеток, представленная на поверхности бактериальных и опухолевых клеток. Механизм взаимодействия антимикробного пептида мелиттина с PS мембранами не установлен. Изучено образование пор в гигантских однослойных везикулах, помещенных в раствор мелиттина разной концентрации. С использованием двухканального флуоресцентного микроскопа показано, что ненасыщенные PS мембраны значительно отличаются от насыщенных в разном фазовом состоянии. Результаты нашей работы создают основы для научных исследований и разработки противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: мелиттин, фосфатидилсерин, липидный бислой, индуцированная пептидом проницаемость, концентрационная зависимость, гигантские однослойные везикулы

DOI: 10.31857/S0026898422060246

Mechanism of Leakage in Phosphatidylserine-Containing Membranes by Melittin

R. Wang^{1, 2}, M.-Y. Shi¹, B.-B. Ma^{1, 2}, and J. Sheng^{1, 2, *}¹*Xinjiang Laboratory of Phase Transitions and Microstructures of Condensed Matter Physics, College of Physical Science and Technology, Yili Normal University, Yining, 835000 China*²*Key Laboratory of Micro-nano Electric Sensing Technology and Bionic Devices, Yili Normal University, Yining, 835000 China*

*e-mail: 2235835064@qq.com

Phosphatidylserine (PS) is an important apoptotic-cell surface signal that exists in bacterial and cancer cells. The mechanism by which melittin interacts with the PS membrane remains unclear. Here, we revealed this mechanism by using a dual-channel fluorescence microscope to observe the concentration-dependent process of pore formation in giant unilamellar vesicles (GUVs) that were exposed to melittin solution. We found that unsaturated PS membranes differed significantly from saturated PS membranes in different phases. This study provides a reference for research and development of anticancer drugs.

Keywords: melittin, phosphatidylserine lipid bilayer, peptide-induced permeation, concentration dependence, giant unilamellar vesicle

[#] Статья представлена авторами на английском языке.

УДК 576.5

TRANSWELL-МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

© 2022 г. А. В. Петровская^а, Е. П. Барыкин^а, А. М. Тверской^а, К. Б. Варшавская^а,
В. А. Митькевич^а, И. Ю. Петрушанко^а, А. А. Макаров^а, *

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: aamakarov@eimb.ru

Поступила в редакцию 13.05.2022 г.

После доработки 20.06.2022 г.

Принята к публикации 29.06.2022 г.

In vitro моделирование гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) при помощи клеток эндотелия мозга, выращиваемых на transwell-мембране, широко применяется при изучении нарушений ГЭБ и факторов, призванных нивелировать эти нарушения. Эндотелиальные клетки, благодаря белкам плотных контактов, обеспечивают избирательную проницаемость для ряда веществ. Низкая по сравнению с физиологической интегральность (т.е. высокая проницаемость) модели ГЭБ осложняет оценку эффектов, получаемых при воздействии на него различными агентами, поэтому крайне важен подбор условий, оптимальных для повышения интегральности барьера. В качестве основы transwell-моделирования мы использовали эндотелиальные клетки мозга мыши bEnd.3. Для установления факторов, усиливающих интегральность ГЭБ, оценивали влияние среды культивирования, числа клеток при высевае, состояния transwell-мембраны, культивирование в присутствии и в отсутствие первичных нейронов мыши и матригеля в качестве матрикса на прохождение флуоресцентной метки через клеточный монослой. Иммуноцитохимическим методом анализировали влияние эмбриональной телячьей сыворотки на белок плотных контактов клаудин-5. Полученные данные о параметрах культивирования вносят вклад в решение проблемы низкой интегральности transwell-модели ГЭБ и приближают модель к физиологически релевантным показателям.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, transwell-мембрана, эндотелиальные клетки bEnd.3

DOI: 10.31857/S0026898422060179

ВВЕДЕНИЕ

In vitro моделирование гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) важно как с фундаментальной точки зрения – для изучения структуры и функции плотных контактов и влияния различных физиологических факторов на проницаемость, так и с прикладной – с целью анализа возможности прохождения лекарственных препаратов через ГЭБ, а также моделирования нарушений ГЭБ при сахарном диабете, рассеянном склерозе, болезни Альцгеймера и других заболеваниях.

Несмотря на то, что ГЭБ – это многокомпонентная структура, состоящая в основном из эндотелиальных клеток, астроцитов, перicyтов и нейронов, ее ключевым элементом являются эндотелиальные клетки, вернее, белки плотных контактов, соединяющие клетки в монослой, отвечающие за его барьерные свойства и контролирующее поступление токсичных веществ из кровотока в мозг [1, 2]. *In vitro* эксперименты проводят как на однокомпонентной модели (монослой

эндотелиальных клеток), так и на двухкомпонентной и многокомпонентной моделях [3, 4].

В качестве основы для *in vitro* моделирования ГЭБ часто используется клеточная transwell-модель, представляющая собой мембрану-вставку с монослоем эндотелиальных клеток в культуральной среде, погруженную в лунку планшета [4, 5]. Мембрана-вставка с эндотелиальными клетками (верхний компартмент модели) имитирует сосудистое русло, а лунка планшета (нижний компартмент модели) – остальные компоненты нейроваскулярной единицы. При этом эндотелиальные клетки поляризованы, поэтому верхний и нижний компартменты не идентичны.

В ряде работ приведены результаты исследований, направленных на оптимизацию клеточного состава модели [4, 6] и усиление интегральных свойств модели за счет добавления различных факторов [7, 8]. Для установления оптимальных условий *in vitro* моделирования ГЭБ на transwell-мембране мы выбрали эндотелиальные клетки bEnd.3 мозга мыши, применяемые для *in vitro* моделирования ГЭБ [9–12]. Клеточная культура

bEnd.3 имеет ряд недостатков при моделировании ГЭБ по сравнению с первичной культурой эндотелиальных клеток, включая низкое трансэндотелиальное электрическое сопротивление и более низкий уровень некоторых белков плотных контактов [13]. При этом уровень этих белков в клетках bEnd.3 достаточен для оценки влияния разных агентов на функциональные свойства клеток [14, 15].

К основным методам функционального анализа клеточного монослоя относятся оценка прохождения флуоресцентной метки через transwell-мембрану и измерение трансэндотелиального сопротивления [16]. Мы выбрали первый способ, основанный на проницаемости эндотелия для флуоресцентной метки и сравнили применимость двух флуоресцентных меток — Na-флуоресцеина и FITC-декстрана — для оценки интегральности ГЭБ. Поскольку в физиологических условиях эндотелиальные клетки формируют плотный монослой, именно параметры отсева клеток и продолжительность их культивирования являются ключевыми для степени интегральности модели — ее основного свойства. С другой стороны, смена культуральной среды и применение эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) также может оказывать влияние на состояние клеток. Так, например, условия культивирования bEnd.3 обычно предусматривают использование среды DMEM с FBS (10%), однако эксперименты по моделированию нарушений ГЭБ при болезни Альцгеймера проводят в среде Opti-MEM, позволяющей сократить концентрацию сыворотки [14, 15]. Поскольку ранее показали, что культивирование эндотелиальных клеток в присутствии нейронов и других клеток — элементов нейроваскулярной единицы [4], приводит к улучшению свойств модели, проницаемость модели оценили как в присутствии нейронов, так и в их отсутствие. Для улучшения интегральных свойств важны также вещества, покрывающие мембрану, поэтому проанализировали культивирование клеток на матригле.

Получены данные по влиянию плотности посева клеток bEnd.3, культуральной среды, матрикса и культивирования клеток эндотелия с нейронами на проницаемость transwell-модели ГЭБ, определено также влияние FBS на экспрессию белка плотных контактов клаудина-5. Полученные результаты позволили предложить оптимальные условия, обеспечивающие наиболее релевантное использование данной модели.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. Клетки эндотелия мозга мыши bEnd.3 культивировали в среде DMEM (“Gibco”, США), содержащей 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Pen-

Strep; “Gibco”), 1% GlutaMax (“Gibco”), 10% FBS (“Gibco”) в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Клетки снимали с подложки при помощи TrypLE (“Thermo Fisher”, США). Среду для культивирования заменяли при пересадке клеток, когда конфлюентность достигала ~80–85%. Все эксперименты проводили на клетках между 7 и 15 пассажами.

Нейроны выделяли из префронтальной коры 12 эмбрионов мыши возраста E18 по протоколу Pruszak J. и соавт. [17]. Нейроны культивировали в среде Neurobasal (“Gibco”), содержащей 2% B-27 (“Gibco”), 0.5 мМ L-глутамин (“Gibco”), фактор роста нервов (100 нг/мл) (“Sigma-Aldrich”, США), фактор роста фибробластов (10 нг/мл) (“Sigma-Aldrich”), гентамицин (“Gibco”) в соотношении 1 : 100.

Проведение экспериментов на культурах клеток.

Для определения влияния культуральной среды на свойства модели среду в апикальном компартменте transwell заменяли на среду DMEM или Opti-MEM, содержащую PenStrep, 1% GlutaMax. В transwell-вставки с DMEM через 4 ч добавляли FBS до 10%, а в transwell-вставки с Opti-MEM через 6 ч вносили FBS до 2.5%.

Для анализа проницаемости модели в присутствии нейронов клетки высевали в базолатеральный компартмент. Эксперимент проводили на 14-й день после посева.

Культивирование клеток на матригле. Матригель (“Corning”, США) разводили согласно протоколу производителя. Transwell-мембраны (“Corning”) покрывали матригелем с люминальной стороны в соответствии с протоколом, опубликованным в работе [18].

Культивирование клеток на transwell-мембране.

Стандартными условиями культивирования клеток на transwell-мембране были: 1) объем среды в наружном (базолатеральном) компартменте 12-луночного планшета 1200 мкл, 24-луночного планшета — 500 мкл; 2) объем среды во внутреннем (апикальном) компартменте — 650 мкл в 12-луночном планшете и 300 мкл в 24-луночном; 3) время культивирования перед экспериментом — 5–6 дней; 4) количество клеток при посеве на transwell-мембрану 12-луночного планшета — 50×10^3 на лунку, если не указано иное.

Оценка проницаемости модели ГЭБ. Проницаемость модели на transwell-мембране оценивали по аналогии с существующими протоколами (рис. 1) [8, 19–21]. Использовали флуоресцентные метки Na-флуоресцеин (376.27 г/моль; “Sigma-Aldrich”) и FITC-декстран (70000 г/моль; “Sigma-Aldrich”). Na-флуоресцеин брали в концентрации 10 мкг/мл (26.58 мкМ), FITC-декстран — 100 мкг/мл (1.43 мкМ) [13, 20, 22]. Пробы отбирали через 15, 30, 45, 60 мин после добавления флуоресцентной метки. В нижний компартмент каждый раз добавляли отобранный ранее

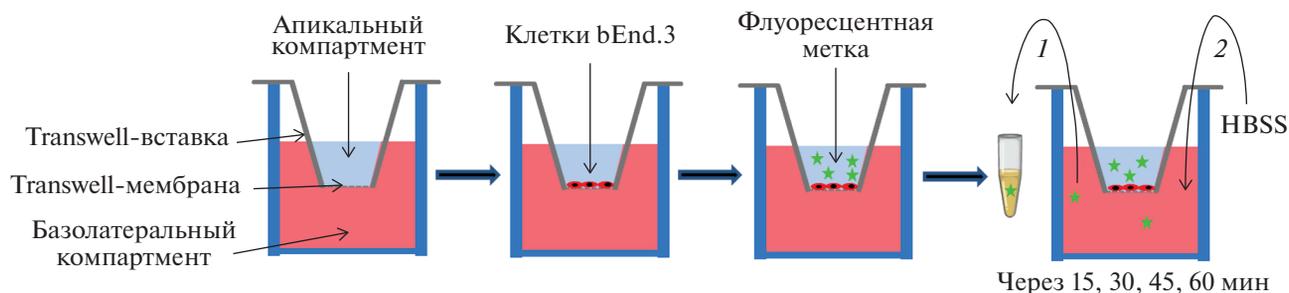


Рис. 1. Схема проведения эксперимента с transwell-мембраной. Клетки bEnd.3 эндотелия мозга мыши высаживали в разных количествах на transwell-мембрану и растили до достижения монослоя. Для оценки проницаемости клеток bEnd.3 на transwell-мембране заменяли культуральную среду на раствор солей Хэнкса (HBSS), затем в апикальный компартмент добавляли флуоресцентные метки Na-флуоресцеин или FITC-декстран (флуоресцеинизотиоцианат-декстран). Через 15, 30, 45 и 60 мин из базолатерального компартмента отбирали часть раствора, которую анализировали с помощью флуоресцентного планшетного ридера. В базолатеральный компартмент добавляли соли Хэнкса в объеме, равном отобранному. В этой модели апикальный компартмент имитирует сосудистое русло, базолатеральный – паренхиме мозга.

объем солей Хэнкса (V ; “Gibco”). Интенсивность флуоресценции измеряли в канале FITC на планшетном ридере SPARK (“Tecan”, Швейцария) при возбуждении на длине волны 485 нм и регистрации флуоресценции на длине волны 535 нм, z-position 16000. В анализе проницаемости учитывали разведение в нижнем компартменте лунки с transwell-вставкой следующим образом:

$$x_{\text{корр}} = x_{\text{изм}} + \left(\frac{V}{V_{\text{общий}}} x_{(t-1)} \right),$$

где $x_{\text{корр}}$ – интенсивность флуоресценции после коррекции с учетом разведения; $x_{\text{изм}}$ – интенсивность флуоресценции, измеренная в каждой временной точке; V – объем, добавленный в нижний компартмент модели в каждой временной точке; $V_{\text{общий}}$ – объем в нижнем компартменте модели; $x(t-1)$ – интенсивность флуоресценции в предшествующей временной точке.

Иммуноцитохимический анализ экспрессии клаудина-5 в присутствии и в отсутствие FBS. Клетки bEnd.3 высевали в 35-мм Glass Bottom Petri Dish (стекло 12 мм) по 50×10^3 клеток на чашку и растили в течение 2 дней. После достижения монослоя среду в чашках заменяли на DMEM, содержащую 10% FBS, либо DMEM без FBS и культивировали в течение еще 2 дней. Клетки промывали дважды PBS, фиксировали в растворе холодного метанола в течение 15 мин, затем дважды отмывали холодным PBS. Для предотвращения неспецифического связывания антител клетки инкубировали в растворе TBST (50 мМ Трис-HCl (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20), содержащем 1% BSA (“Панэко”, Россия), 22.52 мг/мл глицина (“Sigma-Aldrich”) при комнатной температуре в течение 1 ч. Далее клетки инкубировали с моноклональными антителами кролика против кла-

удина-5 (1 : 500, ab131259, “Abcam”, Великобритания) в течение ночи при $+4^{\circ}\text{C}$. После отмывки от первичных антител в PBS клетки инкубировали с вторичными антителами козы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (1 : 1000, 33342, “Invitrogen”, США), в течение 60 мин при комнатной температуре в темноте. Клетки промывали трижды в PBS, ядра окрашивали Hoechst (33342, “Invitrogen”) в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. После промывки PBS флуоресценцию визуализировали с помощью микроскопа Leica DMI 8 с использованием светофильтров FITCbr для регистрации флуоресценции FITC и DAPI/TL – для регистрации флуоресценции Hoechst при увеличении $\times 200$. Среднюю интенсивность флуоресценции на снимках оценивали с помощью EMBL ImageJ (Германия).

Оценка морфологических параметров клеток. Клетки высевали в лунки 24-луночного планшета в плотности, соответствующей высеву 25×10^3 , 50×10^3 и 100×10^3 клеток на transwell-мембрану 24-луночного планшета, т.е. 22.3×10^3 , 44.6×10^3 и 89.2×10^3 клеток на 1 см^2 соответственно. Для оценки морфологии проводили съемку клеток в режиме фазового контраста при увеличении $\times 100$ на микроскопе Leica DMIL LED (США).

Статистическая обработка. Рассчитывали среднеарифметические значения и стандартные отклонения. Статистическую обработку осуществляли с использованием программы GraphPad Prism Software 9.1 (“GraphPad Software Inc.”, США) и однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) с применением критерия Тьюки для множественных сравнений, а также t -критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор протокола культивирования эндотелиальных клеток на transwell-мембране исключительно важен для оценки проницаемости модели ГЭБ. Схема эксперимента по оценке проницаемости приведена на рис. 1. Установлено, что культивирование клеток bEnd.3 в среде DMEM с FBS в концентрации 10% в отличие от культивирования в Opti-MEM с 2.5% FBS способствует интегральности ГЭБ (рис. 2а, б). Поэтому большинство последующих экспериментов проводили в среде DMEM.

Матригель успешно используется в качестве матрикса для культивирования клеток, в том числе эндотелиальных, для моделирования ангиогенеза. Проницаемость transwell-мембраны с матригелем статистически значимо отличается от проницаемости мембраны, не покрытой матригелем: матригель снижает проницаемость пустой мембраны (рис. 2а), тогда как проницаемость мембраны с клетками bEnd.3 в присутствии и в отсутствие матригеля статистически не отличается (рис. 2а). Культивирование на transwell-мембране не позволяет точно оценить конfluence клеток, поэтому параллельно с высевом на transwell-мембрану оценивали влияние матригеля на пролиферацию клеток. По данным фазово-контрастной микроскопии эндотелиальные клетки при длительном культивировании приобретают нитеподобный фенотип и распределяются по поверхности матригеля более гетерогенно, чем при культивировании без матригеля (рис. 3а, б). Характер распределения клеток bEnd.3 через день после посева на матригель отличается от их распределения на пластике, не покрытом матригелем (рис. 3в). Согласно визуальной оценке, оптимальные значения посева на мембрану без матригеля соответствуют 50×10^3 клеток на transwell-мембране 12-луночного планшета (рис. 3а, б). Таким образом, матригель не относится к компонентам, необходимым для культивирования bEnd.3 на transwell-мембране с целью оценки проницаемости ГЭБ.

Нейрональные клетки могут улучшать свойства модели ГЭБ [4], однако нами не выявлено значимых изменений в проницаемости (или интегральности) при культивировании эндотелиальных клеток bEnd.3 с первичными нейронами мыши (рис. 2г). Полученные данные показывают, что нейрональные клетки не улучшают барьерных характеристик клеток bEnd.3.

Далее мы оценили влияние сыворотки на экспрессию клаудина-5, отвечающего за барьерную функцию клеток. Результаты, полученные при окрашивании антителами к клаудину-5, показывают, что уже на 2-й день культивирования морфология клеток bEnd.3, растущих без FBS, отличается от морфологии клеток, культивируемых в

присутствии FBS, т.е. в стандартных условиях (рис. 3в). Клетки, растущие на среде без сыворотки, имеют более вытянутую форму, сходную с наблюдаемой при высеве на мембрану с матригелем. При этом при культивировании без FBS, в отличие от культивирования с сывороткой, не наблюдается неравномерности в распределении клеток. Кроме того, в клетках, культивируемых без FBS, уровень флуоресцентного сигнала от клаудина-5 повышается на 26% (рис. 3в), что может говорить о более высоком уровне экспрессии этого белка в отсутствие сыворотки. Обнаружена также тенденция к увеличению числа клеток при культивировании без сыворотки. Таким образом, для моделирования ГЭБ клетки bEnd.3 лучше культивировать без сыворотки.

Чтобы оценить возможность повторного использования transwell-вставок в модели на основе bEnd.3, мы проанализировали прохождение флуоресцентной метки (Na-флуоресцеин, 10 мкг/мл) через очищенную мембрану без клеток и с монослоем клеток bEnd.3. Эти параметры сопоставили с параметрами новой transwell-мембраны с клетками bEnd.3 и без них. Мембраны, использованные ранее, перед повторным использованием обрабатывали 2 раза TrypLE (каждый раз не менее 2 ч), затем промывали 2 раза деионизированной водой (Milli-Q, "Millipore", США) и PBS. Очевидно, что transwell-вставки можно использовать повторно: не выявлено различий в прохождении метки через пустую повторно используемую и пустую новую мембрану (рис. 4а). Не отличается также прохождение метки через новую и повторно используемую мембрану с клетками bEnd.3 (рис. 4а). Таким образом, применение традиционного способа снятия клеток с мембраны с помощью TrypLE достаточно для повторного использования transwell-мембраны.

Выбор флуоресцентной метки важен для регистрации барьерной функции. Сравнение прохождения двух флуоресцентных меток (Na-флуоресцеина и FITC-декстрана) через transwell-мембрану показало, что проницаемость барьера для FITC-декстрана лучше коррелирует с плотностью монослоя, т.е. при увеличении количества клеток на transwell-мембране прохождение FITC-декстрана снижается сильнее, чем Na-флуоресцеина (рис. 4б, в).

Не менее важен вопрос о соответствии параметров *in vitro* модели параметрам *in vivo*. Так, электрическое сопротивление ГЭБ в паренхиме мозга составляет около 8000 Ом/см^2 [23], тогда как проницаемость модели на основе bEnd.3 на 3 сутки после посева составляет $37.3 \pm 3.1 \text{ Ом/см}^2$ [24] и далее существенно не увеличивается (около 40 Ом/см^2 на 7-й день). Все это приводит к значимости усовершенствования модели и подбора условий, начиная с базовых особенностей куль-

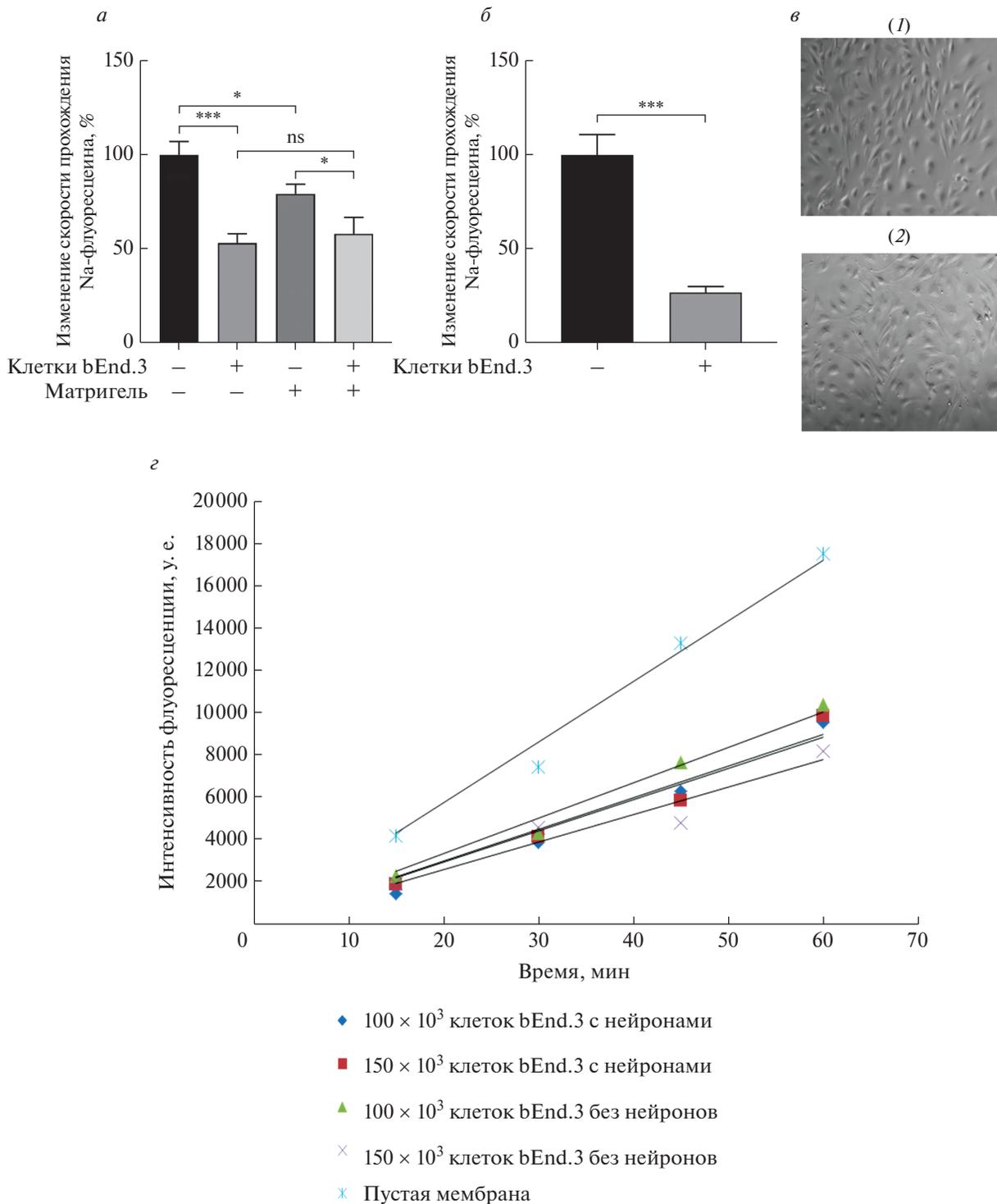


Рис. 2. Параметры, влияющие на интегральность модели ГЭБ, основанной на линии эндотелиальных клеток bEnd.3. *а* – Проницаемость однокомпонентной модели для Na-флуоресцеина после 7 дней культивирования на transwell-мембране в присутствии или в отсутствие матригеля и клеток bEnd.3. Среда культивирования Opti-MEM с 2.5% FBS. *б* – Проницаемость однокомпонентной модели на основе bEnd.3, культивируемых в среде DMEM с 10% FBS. *в* – Фазово-контрастная микроскопия клеток bEnd.3 в первые сутки после высева на лунку 24-луночного планшета (1) и лунку 24-луночного планшета, покрытого матригелем (2). Увеличение $\times 10$. *з* – Проницаемость модели при высева клеток bEnd.3 в количестве 100×10^3 и 150×10^3 на мембрану 12-луночного планшета в присутствии и в отсутствие нейронов. *а* и *б* – Приведены средние арифметические значения и стандартное отклонения, $n = 9$. Использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA) с применением критерия Тьюки для множественных сравнений (*а*) и *t*-критерия Стьюдента (*б*) для определения значения p . * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns – статистическая значимость отсутствует.

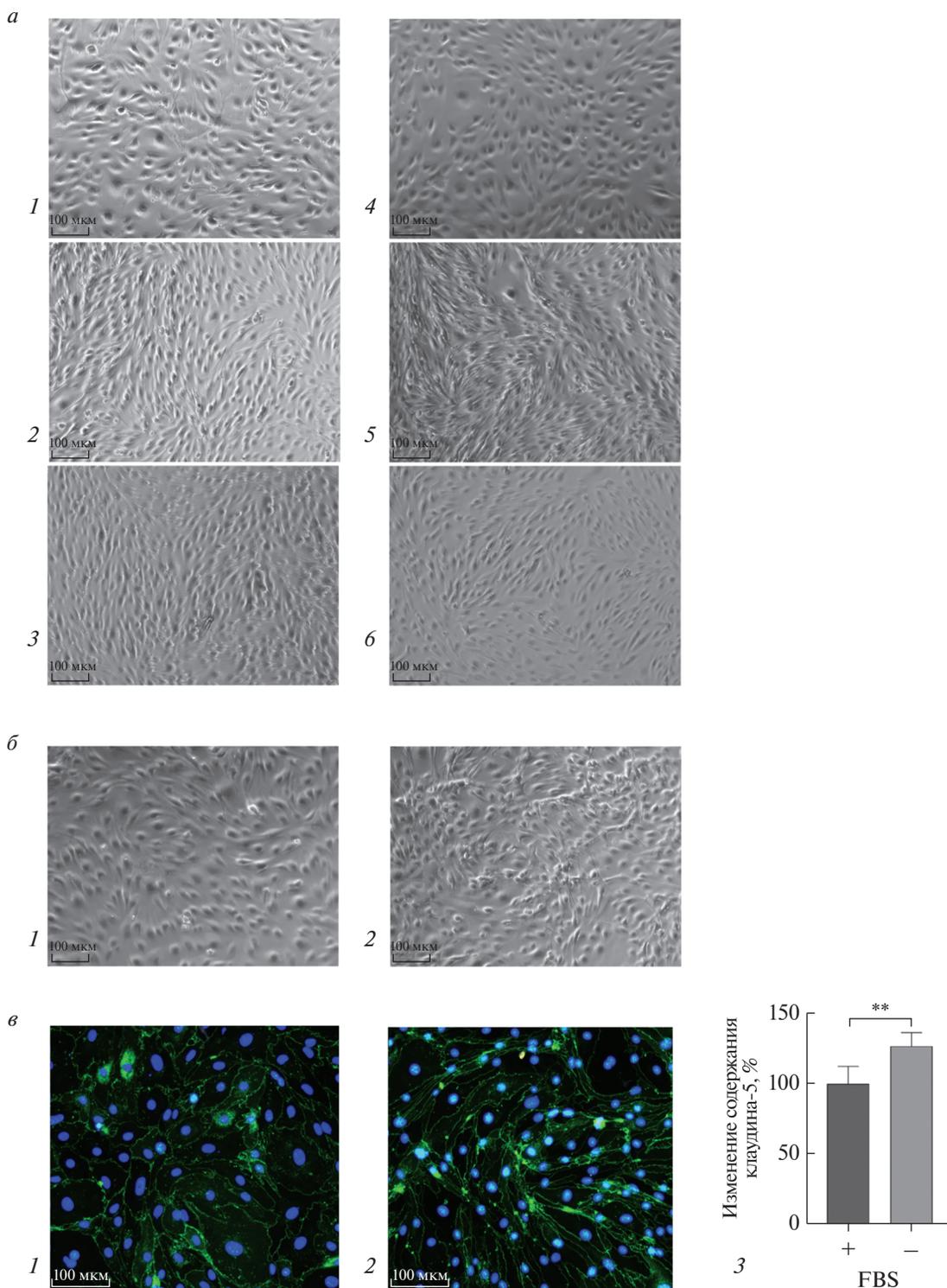


Рис. 3. Влияние матрикеля и сыворотки на морфологию bEnd.3 и экспрессию белка плотных контактов клаудина-5. *a* – Клетки, высеянные в количестве, соответствующем 25×10^3 (1, 4), 50×10^3 (2, 5), 100×10^3 (3, 6), на transwell-вставку 12-луночного планшета на 4-е сутки, где 1, 2, 3 – высев на мембрану, не покрытую матрикелем; 4, 5, 6 – на мембрану, покрытую матрикелем. *б* – Клетки, высеянные в количестве 50×10^3 (1, 2) на transwell-вставку 12-луночного планшета, не покрытую (1) и покрытую (2) матрикелем, на 8-е сутки. *а* и *б* – Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 10$, шкала – 100 мкм. *в* – Флуоресцентная микроскопия клеток, культивируемых с FBS (1) и без FBS (2) после 48 ч инкубации; изменение содержания клаудина-5 (3). Зеленая флуоресценция – окрашивание антителами на клаудин-5, голубая флуоресценция – ядра клеток, окрашенные Hoechst. Увеличение $\times 200$, шкала – 100 мкм. Среднюю флуоресценцию клаудина-5 на снимках рассчитывали с помощью программы EMBL ImageJ. На рис. *в* (3) приведены средние арифметические значения и стандартные отклонения, $n = 9$. Использовали *t*-критерий Стьюдента для определения значения p . ** $p < 0.01$.

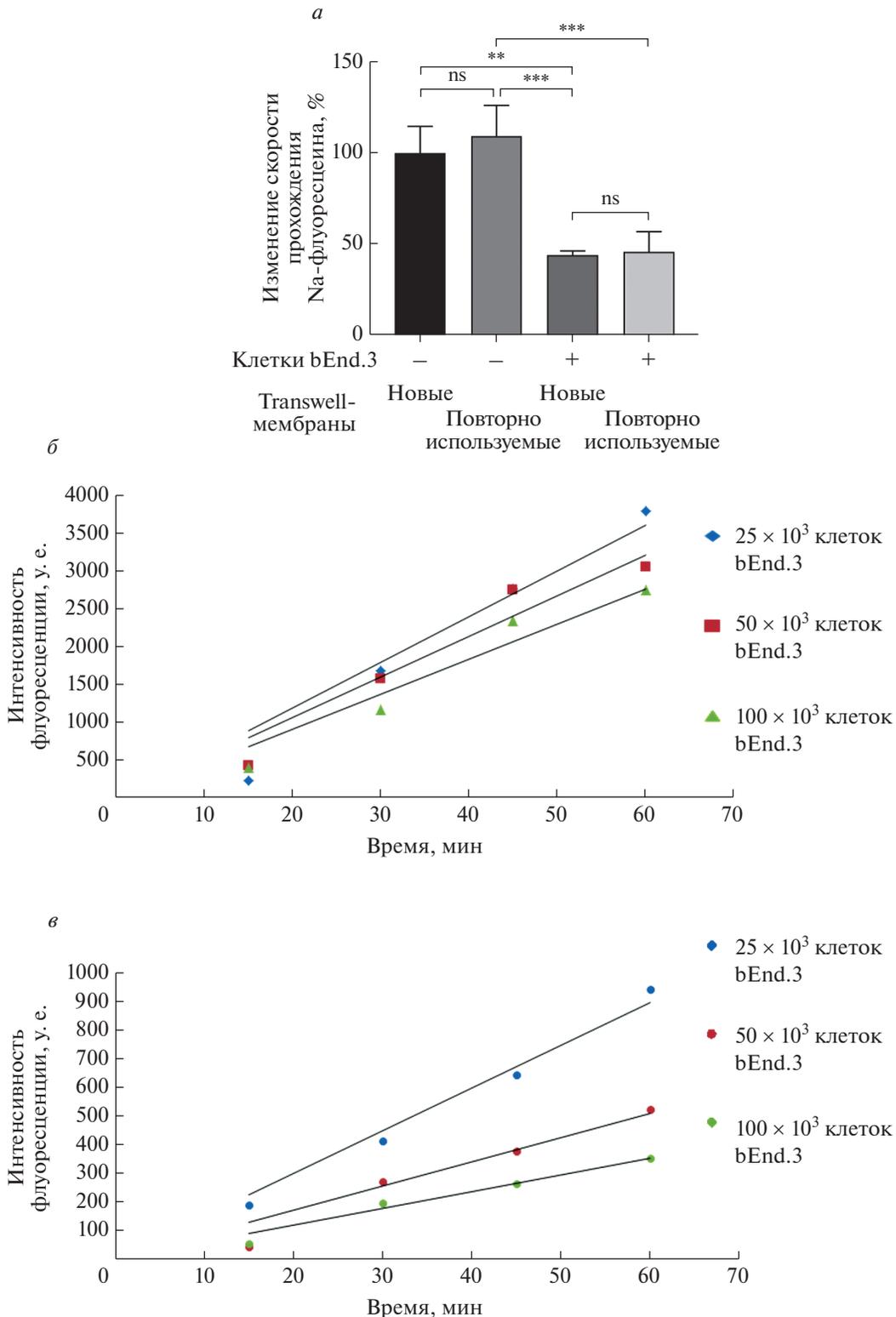


Рис. 4. Проницаемость модели ГЭБ, основанной на клеточной культуре bEnd.3, в зависимости от состояния transwell-мембраны и типа флуоресцентной метки. **а** – Проницаемость повторно используемых transwell-мембран 12-луночного планшета (пустых и с клетками bEnd.3) и новых transwell-мембран с монослоем клеток bEnd.3 и без клеток. **б, в** – Проницаемость однокомпонентной transwell-модели ГЭБ на основе bEnd.3 для Na-флуоресцеина (10 мкг/мл) (**б**) и FITC-декстрана (100 мкг/мл) (**в**). Приведены средние арифметические значения и стандартные отклонения, $n = 9$. Использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA) с применением критерия Тьюки для множественных сравнений и определения значения p . ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns – отсутствует статистическая значимость.

тивирования и выбора клеточной культуры и заканчивая изменением параметров анализа.

В нашей работе выявлен ряд параметров для моделирования ГЭБ *in vitro*. Наилучшими условиями для оценки проницаемости ГЭБ с использованием клеток bEnd.3 в качестве модели являются: культивирование клеток на среде DMEM, не менее $(50-100) \times 10^3$ клеток на transwell-мембрану 12-луночного планшета и культивирование в течение пяти и более дней в отсутствие матригеля. Для повышения плотности клеток и увеличения уровня белков плотных контактов предпочтительнее культивировать клетки без FBS.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-15-2020-795, Соглашение № 13.1902.21.0027 от 29.09.2020, ID проекта: RF-190220X0027).

В работе соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных.

Конфликт интересов не заявляется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sweeney M.D., Zhao Z., Montagne A., Nelson A.R., Zlokovic B.V. (2019) Blood-brain barrier: from physiology to disease and back. *Physiol. Rev.* **99**, 21–78.
- Abbott N.J., Patabendige A.A.K., Dolman D.E.M., Yusof S.R., Begley D.J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13–25.
- Zheng Y.-F., Zhou X., Chang D., Bhuyan D.J., Zhang J.P., Yu W.Z., Jiang X.S., Seto S.W., Yeon S.Y., Li J., Li C.G. (2021) A novel tri-culture model for neuroinflammation. *J. Neurochem.* **156**, 249–261.
- Stone N.L., England T.J., O'Sullivan S.E. (2019) A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 230.
- Hatherell K., Couraud P.-O., Romero I.A., Weksler B., Pilkington G.J. (2011) Development of a three-dimensional, all-human *in vitro* model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J. Neurosci. Meth.* **199**, 223–229.
- Ito R., Umehara K., Suzuki S., Kitamura K., Nunoya K., Yamaura Y., Imawaka H., Izumi S., Wakayama N., Komori T., Anzai N., Akita H., Furihata T. (2019) A human immortalized cell-based blood-brain barrier triculture model: development and characterization as a promising tool for drug-brain permeability studies. *Mol. Pharm.* **16**, 4461–4471.
- Furihata T., Kawamatsu S., Ito R., Saito K., Suzuki S., Kishida S., Saito Y., Kamiichi A., Chiba K. (2015) Hydrocortisone enhances the barrier properties of HBMEC/ciβ, a brain microvascular endothelial cell line, through mesenchymal-to-endothelial transition-like effects. *Fluids Barriers CNS.* **12**, 7.
- Dohgu S., Sumi N., Nishioku T., Takata F., Watanabe T., Naito M., Shuto H., Yamauchi A., Kataoka Y. (2010) Cyclosporin A induces hyperpermeability of the blood-brain barrier by inhibiting autocrine adrenomedullin-mediated up-regulation of endothelial barrier function. *Eur. J. Pharmacol.* **644**, 5–9.
- Yue Q., Zhou X., Zhang Z., Hoi M.P.M. (2022) Murine beta-amyloid (1–42) oligomers disrupt endothelial barrier integrity and VEGFR signaling via activating astrocytes to release deleterious soluble factors. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1878.
- Park J., Baik S.H., Han S.H., Cho H.J., Choi H., Kim H.J., Choi H., Lee W., Kim D.K., Mook-Jung I. (2017) Annexin A1 restores Aβ1–42-induced blood-brain barrier disruption through the inhibition of RhoA-ROCK signaling pathway. *Aging Cell.* **16**, 149–161.
- Sekhar G.N., Georgian A.R., Sanderson L., Vizcay-Barrena G., Brown R.C., Muresan P., Fleck R.A., Thomas S.A. (2017) Organic cation transporter 1 (OCT1) is involved in pentamidine transport at the human and mouse blood-brain barrier (BBB). *PLoS One.* **12**, e0173474.
- Qie X., Wen D., Guo H., Xu G., Liu S., Shen Q., Liu Y., Zhang W., Cong B., Ma C. (2017) Endoplasmic reticulum stress mediates methamphetamine-induced blood-brain barrier damage. *Front. Pharmacol.* **8**, 639.
- Puscas I., Bernard-Patrzyński F., Jutras M., Lécuyer M.-A., Bourbonnière L., Prat A., Leclair G., Roullin V.G. (2019) IVIVC assessment of two mouse brain endothelial cell models for drug screening. *Pharmaceutics.* **11**, 587.
- Chen W., Chan Y., Wan W., Li Y., Zhang C. (2018) Aβ1–42 induces cell damage via RAGE-dependent endoplasmic reticulum stress in bEnd.3 cells. *Exp. Cell Res.* **362**, 83–89.
- Chan Y., Chen W., Wan W., Chen Y., Li Y., Zhang C. (2018) Aβ1–42 oligomer induces alteration of tight junction scaffold proteins via RAGE-mediated autophagy in bEnd.3 cells. *Exp. Cell Res.* **369**, 266–274.
- Czupalla C.J., Liebner S., Devraj K. (2014) *In vitro* models of the blood-brain barrier. In: *Cerebral angiogenesis: Methods and Protocols*. Ed. Milner R. New York: Springer, 415–437.
- Pruszek J., Just L., Isacson O., Nikkha G. (2009) Isolation and culture of ventral mesencephalic precursor cells and dopaminergic neurons from rodent brains. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* Ch. 2, Unit 2D.5.
- Li G., Simon M.J., Cancel L.M., Shi Z.-D., Ji X., Tarbell J.M., Morrison B., Fu B.M. (2010) Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: *in vitro* blood-brain barrier models for drug delivery studies. *Ann. Biomed. Eng.* **38**, 2499–2511.
- Mertsch K., Blasig I., Grune T. (2001) 4-Hydroxynonenol impairs the permeability of an *in vitro* rat blood-brain barrier. *Neurosci. Lett.* **314**, 135–138.
- Wan W., Cao L., Liu L., Zhang C., Kalionis B., Tai X., Li Y., Xia S. (2015) Aβ(1–42) oligomer-induced leakage in an *in vitro* blood-brain barrier model is associated with up-regulation of RAGE and metalloproteinases, and down-regulation of tight junction scaffold proteins. *J. Neurochem.* **134**, 382–393.

21. Al Ahmad A., Gassmann M., Ogunshola O.O. (2009) Maintaining blood-brain barrier integrity: pericytes perform better than astrocytes during prolonged oxygen deprivation. *J. Cell. Physiol.* **218**, 612–622.
22. Kook S.-Y., Hong H.S., Moon M., Ha C.M., Chang S., Mook-Jung I. (2012) A β_{1-42} -RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood–brain barrier via Ca²⁺-calcineurin signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 8845–8854.
23. Smith Q.R., Rapoport S.I. (1986) Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium, and chloride. *J. Neurochem.* **46**, 1732–1742.
24. He F., Yin F., Peng J., Li K.-Z., Wu L.-W., Deng X.-L. (2010) Immortalized mouse brain endothelial cell line bEnd.3 displays the comparative barrier characteristics as the primary brain microvascular endothelial cells. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. J. Contemp. Pediatr.* **12**, 474–478.

BLOOD–BRAIN BARRIER TRANSWELL-MODELING

A. V. Petrovskaya¹, E. P. Barykin¹, A. M. Tverskoi¹, K. B. Varshavskaya¹, V. A. Mitkevich¹,
I. Yu. Petrushanko¹, and A. A. Makarov¹, *

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: aamakarov@eimb.ru

In vitro blood–brain barrier (BBB) modeling with the use of the brain endothelial cells grown on a transwell membrane is widely used to investigate the BBB disorders and factors intended to ameliorate these pathologies. Endothelial cells, due to tight junction proteins, cause selective permeability for a number of substances. The low integrity (i.e., high permeability) of the BBB model, as compared to the physiological one, complicates the evaluation of the effects caused by different agents. Thus, the selection of conditions to improve the barrier integrity is an extremely essential task. In this study, the mouse endothelial cells bEnd.3 are used in the experiments on transwell modeling. To determine factors, enhancing the BBB integrity, the effects of the cultivation medium, the number of cells during seeding, the state of the transwell membrane, cultivation in the presence or in the absence of primary mouse neurons and matrigel as a matrix on the passage of a fluorescent label through the cell monolayer were assessed. The effect of fetal bovine serum on tight junction protein claudin-5 was analyzed by immunocytochemistry. The obtained cultivation parameters data facilitate to the solution to the problem of the BBB transwell model low integrity and bring the model closer to the physiologically relevant indicators.

Keywords: blood–brain barrier, transwell membrane, endothelial cells bEnd.3

УДК 57.578.7

ВЫСОКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ И RBD-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ У РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ COVID-19

© 2022 г. Е. А. Астахова^{a, b}, М. Г. Бязрова^{a, b, c}, Г. М. Юсубалиева^d,
В. Ф. Ларичев^e, В. П. Баклаушев^d, А. В. Филатов^{a, b, *}

^aГосударственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства, Москва, 115522 Россия

^bКафедра иммунологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^cРоссийский университет дружбы народов (РУДН) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Москва, 117198 Россия

^dФедеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, 115682 Россия

^eНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

*e-mail: avfilat@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.06.2022 г.

После доработки 05.07.2022 г.

Принята к публикации 05.07.2022 г.

К важным иммунологическим характеристикам переболевших COVID-19, а также вакцинированных относятся показатели гуморального ответа. Широкое распространение получил анализ уровня вируссвязывающих антител. Наиболее точным предиктором эффективной иммунной защиты от симптомного течения инфекции SARS-CoV-2 считается титр вируснейтрализующих антител. Мы оценили вируснейтрализующую активность плазмы лиц ($n = 111$), переболевших COVID-19 в период с апреля по сентябрь 2020 года. Для анализа использовали три независимых метода: конвенциональный с живым вирусом, с псевдотипированными белком шипа вирусоподобными частицами и суррогатный тест нейтрализации вируса (cVNT, pVNT и sVNT соответственно). Для сравнения измеряли уровни антител IgG, IgA и IgM против рецепторсвязывающего домена (RBD) белка шипа SARS-CoV-2. Уровни вируссвязывающих, а также вируснейтрализующих антител в постановке как cVNT, так и pVNT имели большой разброс. Высокая корреляция выявлена при сравнении результатов cVNT и pVNT, а результаты sVNT хорошо согласовывались как с cVNT, так и с pVNT. В наибольшей степени с результатами cVNT, pVNT и sVNT коррелировал уровень IgG-антител. Полученные результаты могут использоваться при отборе плазм, наилучшим образом подходящих для трансфузии и лечения острого течения COVID-19. Кроме того, данные по вируснейтрализующей активности плазмы важны для выбора потенциальных доноров для выделения SARS-CoV-2-специфичных В-лимфоцитов – с целью дальнейшего получения моноклональных вируснейтрализующих антител.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, вируснейтрализующие антитела, плазма крови, реконвалесценты

DOI: 10.31857/S0026898422060064

В условиях нынешней пандемии COVID-19 большое значение придается серологическому анализу биологических образцов. Гуморальный иммунный ответ – важная характеристика как

для переболевших естественным путем, так и вакцинированных людей [1]. Мониторинг уровней антител против SARS-CoV-2 необходим для прогнозирования риска повторного заражения и

Сокращения: cVNT (conventional virus neutralization test) – конвенциональный вируснейтрализующий тест; ID₅₀ (half-maximal inhibitory dilution) – разведение, обеспечивающее 50%-ное ингибирование; IQR (interquartile range) – межквартильный диапазон; pVNT (pseudovirus-based virus neutralization test) – вируснейтрализующий тест с псевдотипированными вирусоподобными частицами; S (spike) protein – белок шипа; RBD (receptor-binding domain) – рецепторсвязывающий домен; sVNT (surrogate virus neutralization test) – суррогатный вируснейтрализующий тест; VLP (virus-like particles) – вирусоподобные частицы.

оценки эффективности вакцинации. Кроме того, эти показатели используют для ретроспективного отслеживания контактов заболевших пациентов, оценки числа бессимптомных носителей, а также уровня коллективного иммунитета.

В серологических анализах на SARS-CoV-2 в качестве антигенов обычно используют два вирусных белка: нуклеопротеин (N) или белок шипа (S). SARS-CoV-2 связывается со своим рецептором на хозяйской клетке через рецепторсвязывающий домен (RBD) S-белка, поэтому именно RBD рассматривают как основную мишень для нейтрализующих антител [2]. В силу этого данные по S- и RBD-связывающим антителам могут косвенно указывать на нейтрализующую активность сыворотки. Высокий уровень вируснейтрализующих антител – хороший предиктор эффективной иммунной защиты от симптоматического течения COVID-19 [3, 4], поэтому определение вируссвязывающих антител необходимо дополнять прямым измерением уровня вируснейтрализующих антител. Заметим, что анализ на вируссвязывающие антитела достаточно хорошо отработан и широко распространен в лабораторной практике, в то время как определение вируснейтрализующих антител доступно только специализированным лабораториям.

На начальных этапах пандемии SARS-CoV-2, когда остро ощущалось отсутствие надежных терапевтических средств для лечения COVID-19, трансфузия плазмы реконвалесцентов была единственным возможным вариантом этиотропной терапии. Переливание плазмы, полученной от доноров, переболевших COVID-19, потенциально может обеспечить немедленную пассивную иммунизацию и защиту организма от инфекции SARS-CoV-2. Однако практические итоги плазмотерапии оказались очень неоднозначными. Наиболее успешным считается применение конвалесцентной плазмы на ранних этапах заболевания – вскоре после госпитализации. К решающим факторам также относится использование плазмы с высоким титром антител к S-белку или RBD. При правильно подобранных параметрах трансфузия конвалесцентной плазмы обеспечивала более чем двукратное, по сравнению с контрольными группами, увеличение выживаемости пациентов [5]. Все это указывает на то, что плазме, предназначенную для трансфузии, необходимо строго контролировать по вируснейтрализующей активности.

Известно несколько методов определения вируснейтрализующей активности сывороток, каждый из которых подразделяют на несколько субвариантов. Это, в первую очередь, метод с использованием нативного живого вируса SARS-CoV-2 – конвенциональный вируснейтрализующий тест (cVNT; conventional virus neutralization test), – с использованием

вирусоподобных частиц, псевдотипированных S-белком (pVNT; pseudovirus-based virus neutralization test) [6], и, наконец, суррогатный VNT (sVNT) [7].

Цель исследования состояла в сравнении вируснейтрализующей активности образцов плазмы реконвалесцентов, определенной тремя различными методами: cVNT, pVNT и sVNT. Предпринята попытка оценить вариабельность вируснейтрализующей активности образцов плазмы и сравнить ее с вируссвязывающей активностью тех же проб.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика пациентов. В исследование были включены добровольцы ($n = 111$), которые в период с апреля по сентябрь 2020 года переболели COVID-19. Большая часть пациентов (86%) проходила стационарное лечение в ФНКЦ ФМБА России, остальные – в других медицинских учреждениях г. Москвы или на дому. Всем участникам был поставлен диагноз COVID-19 на основании ПЦР-тестирования и/или клинических данных. Через 1–3 месяца после перенесенного COVID-19 добровольцы сдали плазму крови в ФНКЦ ФМБА России для последующего переливания больным пациентам. Заготовку плазмы проводили методом плазмафереза, объем заготавливаемой плазмы составлял 640 мл для каждого донора. В проведенном нами исследовании использованы 100-микролитровые аликвоты плазмы.

Пациенты, выздоровевшие от COVID-19, были в возрасте от 18 до 52 лет (медиана – 38 лет, межквартильный диапазон (interquartile range, IQR) – 21–43 лет); из них 68 мужчин (61.2%) и 43 женщины (38.8%). В группу сравнения были включены здоровые доноры ($n = 25$). Группа сравнения по возрасту и по соотношению мужчин и женщин соответствовала группе переболевших. Венозную кровь здоровых добровольцев собирали в гепаринизированные пробирки (“Sarstedt, Nümbrecht”, Германия), после чего пробирки центрифугировали 10 мин при 300 g и отбирали плазму. Образцы плазмы (аликвоты по 100 мкл) замораживали и хранили при -70°C .

Определение анти-RBD-антител методом иммуноферментного анализа (ИФА). Концентрацию анти-RBD-антител в плазме определяли методом ИФА с использованием коммерческих планшетов, сенсibilизированных RBD (#K153G, “Хема Медика”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. В качестве проявляющих реагентов использовали антитела против IgG, IgA и IgM человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cat. No. 109-036-088, 109-035-129, 109-035-011, “Jackson Immuno Research”, США). Реакцию ИФА проявляли при добавлении в каждую лунку 100 мкл субстрата пероксидазы – 3,3',5,5'-тетра-

метил бензидина (ТМВ) – и инкубировали до появления синего окрашивания. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента. Оптическую плотность полученного раствора измеряли с помощью фотометра BioRad iMark Microplate Absorbance Reader (“Bio-Rad”, США).

Все образцы титровали для нахождения линейного участка на графике зависимости оптической плотности (OD_{450}) от разведения плазмы. Для определения концентрации антител использовали точку, находившуюся в середине линейного участка кривой титрования. Концентрацию анти-RBD-антител IgG определяли в абсолютных единицах (нг/мл), используя в качестве стандарта человеческое моноклональное антитело 34B12 с известной концентрацией (любезно предоставлено д.б.н. А.В. Тараниным, Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск [8]). Концентрацию анти-RBD-антител IgA и IgM определяли в относительных единицах, используя в качестве стандарта плазму одного из доноров.

Определение вируснейтрализующих антител методом $sVNT$. Анализ проводили на клетках Vero E6, которые инфицировали аутентичным SARS-CoV-2 (штамм hCoV-19/Russia/Moscow-PMVL-12/2020) в дозе 100 ТЦИД₅₀ (50%-ная тканевая цитопатическая инфекционная доза). Результаты цитопатической реакции регистрировали через 96 ч в инвертируемом микроскопе. Цитопатический эффект оценивали визуально. Вируснейтрализующую активность образцов плазмы определяли по подавлению цитопатического действия вируса. Цитопатический эффект вируса в отсутствие плазмы был принят за 100%. Плазму титровали, начиная с разведения 1 : 10. За титр антител принимали наибольшее разведение плазмы, при котором еще не развивался цитопатический эффект на 100 ТЦИД₅₀ вируса. Опыты по нейтрализации сопровождалась контролем рабочей дозы вируса, токсичности и стерильности сывороток.

Определение вируснейтрализующих антител методом $rVNT$. Этот анализ проводили на клетках HEK-293, стабильно трансфицированных плазмидой, экспрессирующей ангиотензинконвертирующий фермент-2 (ACE2). К клеткам-мишеням добавляли лентивирусные вирусоподобные частицы (VLPs), псевдотипированные S-белком SARS-CoV-2. VLPs несли репортный ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), который экспрессировался в инфицированных клетках. Дозу VLPs подбирали таким образом, чтобы в отсутствие антител было инфицировано 50% клеток-мишеней – их детектировали по флуоресценции GFP с помощью проточного цитометра CytoFLEX S (“Beckman Coulter”, США). При полном ингибировании инфекции клетки-мишени не давали флуоресцентного сигнала. Для каждой сыворотки делали 5 по-

следовательных разведений, начиная с 1 : 4, с шагом 5. Результаты представляли как разведение сыворотки, при котором наблюдали 50%-ное ингибирование (ID_{50}) заражения клеток, рассчитанное по графику титрования Sigmoidal, 5PL, в программе GraphPad Prism (США).

Определение вируснейтрализующих антител методом $sVNT$. Этот анализ проводили с использованием набора SARS-CoV-2 ВНАФА К533 (#2104, “Хема Медика”) в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы плазмы разводили в 10 раз буфером для образцов и добавляли к ним раствор конъюгата RBD с пероксидазой хрена (RBD-HRP) в соотношении 1 : 10 (v/v). Смесь инкубировали 30 мин при 37°C, после чего 100 мкл реакционной смеси переносили в планшет, сенсублизованный ACE2, и инкубировали еще 30 мин при 37°C. Лунки 5 раз промывали буфером для отмывки. Реакцию проявляли и регистрировали также, как описано выше при выполнении ИФА. Данные анализировали с помощью программного обеспечения Zefira 4.0.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версия 8.4.3 (GraphPad, США). Значимость различий между выборками оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. Различия сравниваемых параметров считали статистически значимыми при $p < 0.05$. На графиках показаны медианы (средняя линия), третий и первый квартили (прямоугольники), усы показывают 1.5-кратный межквартильный размах. Количественную оценку статистической связи между параметрами проводили, рассчитывая коэффициенты линейной регрессии, а также ранговой корреляции по Спирмену (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании приняли участие пациенты, которые переболели COVID-19 в период с апреля по сентябрь 2020 года. В это время в России циркулировал Уханьский штамм SARS-CoV-2 или его вариант с заменой D614G в S-белке [9–11].

Уровень RBD-связывающих антител

Прежде всего в плазме пациентов, перенесших COVID-19, определяли уровень RBD-связывающих антител. На рис. 1 представлены результаты количественного определения IgG и полуколичественного определения уровней IgA и IgM анти-RBD-антител. В качестве отрицательного контроля приведены результаты, полученные для здоровых доноров.

Для IgG-антител у выздоровевших пациентов медиана равнялась 1819.7 нг/мл (IQR 635.3–4753.4), в то время как для здоровых доноров она

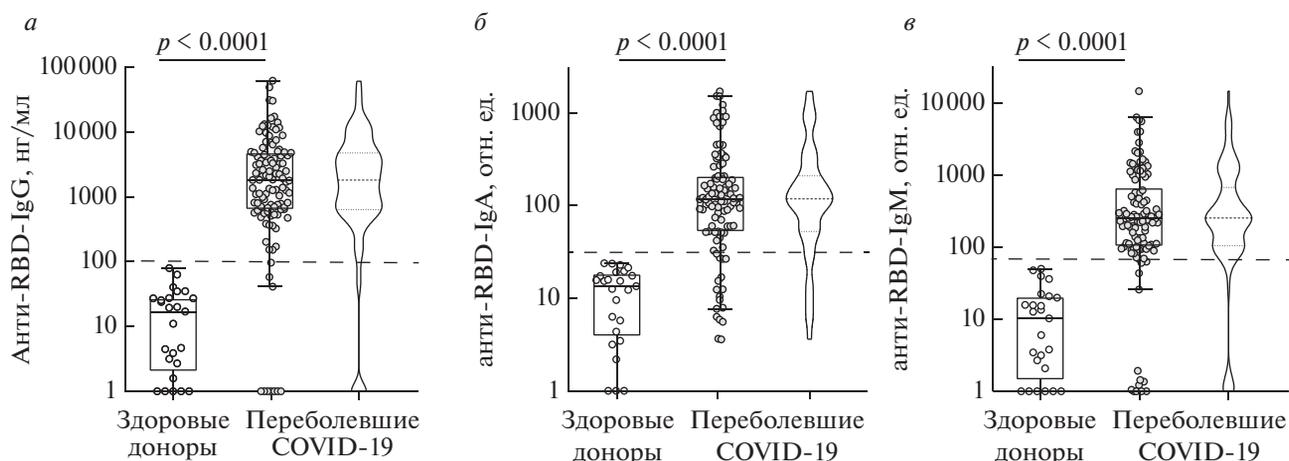


Рис. 1. Распределение уровней антител IgG (а), IgA (б) и IgM (в) к RBD белка шипа SARS-CoV-2 у пациентов, переболевших COVID-19. Слева коробчатые, а справа скрипичные диаграммы. Каждая точка представляет образец плазмы. Серыми точками обозначены образцы, полученные от пациентов, переболевших COVID-19; белыми точками — от здоровых добровольцев. Горизонтальные пунктирные линии обозначают порог отсеечения.

составляла 16.9 нг/мл (IQR 2.0–27.4) ($p < 0.0001$). Для IgA-антител эти величины равнялись 118.0 отн. ед. (IQR 52.72–208.9) и 13.5 отн. ед. (IQR 3.9–18.3) соответственно ($p < 0.0001$); для IgM-антител — 251.8 отн. ед. (IQR 103.5–669.9) и 10.3 отн. ед. (IQR 1.44–20.41) соответственно ($p < 0.0001$).

Анализ распределения уровня антител по выборке пациентов показал высокую гетерогенность этого параметра. Содержание RBD-связывающих антител довольно широко варьировало, изменяясь в пределах 5, 3 и 4 порядков соответственно для антител IgG, IgA и IgM. При этом характер распределения RBD-специфических антител IgG и IgM заметно отличался от нормального, что было подтверждено анализом по методу Д'Агостино-Пирсона ($p < 0.0001$). Мы предположили, что причина отклонения от нормального распределения заключается в наличии нескольких нулевых значений RBD-специфических антител IgG и IgM. При исключении нулевых значений из выборок распределение значений по антителам IgG и IgM приобретало соответственно нормальный характер и приближалось к нормальному ($p = 0.8170$ и $p = 0.0504$). Для IgA-антител исходное распределение было близким к нормальному ($p = 0.2911$).

Уровень вируснейтрализующих антител

Вируснейтрализующую активность образцов плазмы определяли с помощью трех независимых методов: sVNT, pVNT и sVNT. У большей части участников обнаружены вируснейтрализующие антитела: 101/111 (91%), 91/111 (82%) и 88/111 (79%) пациентов соответственно.

Уровни вируснейтрализующих антител, определенные методами sVNT и pVNT, отличались гетерогенностью (рис. 2), в то время как результаты sVNT варьировали в пределах двух порядков. Это вполне объяснимо, так как результаты sVNT выражаются в процентах нейтрализации вируса, что, по определению, не превышает 100%. Реальное распределение результатов sVNT могло быть более широким, чего не наблюдалось, так как образцы плазмы с высокими титрами попадали в область насыщения.

Распределение вируснейтрализующей активности образцов плазмы также, как и уровней RBD-связывающих антител, отклонялось от нормального вида. Одним из проявлений такого распределения было наличие точек с нулевой вируснейтрализующей активностью. Можно предположить, что нулевые точки появились в результате ошибочного включения в исследуемую группу лиц, которые не болели COVID-19. В таком случае образцы взятой у них плазмы давали бы нулевые значения сразу в нескольких тестах, но этого не наблюдалось. Вероятно, появление нулевых точек обусловлено различной чувствительностью и/или специфичностью используемых тест-систем.

Взаимосвязь уровней RBD-связывающих антител и вируснейтрализующей активности

С целью оценить взаимосвязь между результатами, полученными разными методами, мы провели корреляционный анализ. Прежде всего, оценили связь между данными по связыванию антител с RBD, с одной стороны, и вируснейтрализующей активностью — с другой (рис. 3а). В наибольшей степени с результатами sVNT, pVNT и sVNT коррели-

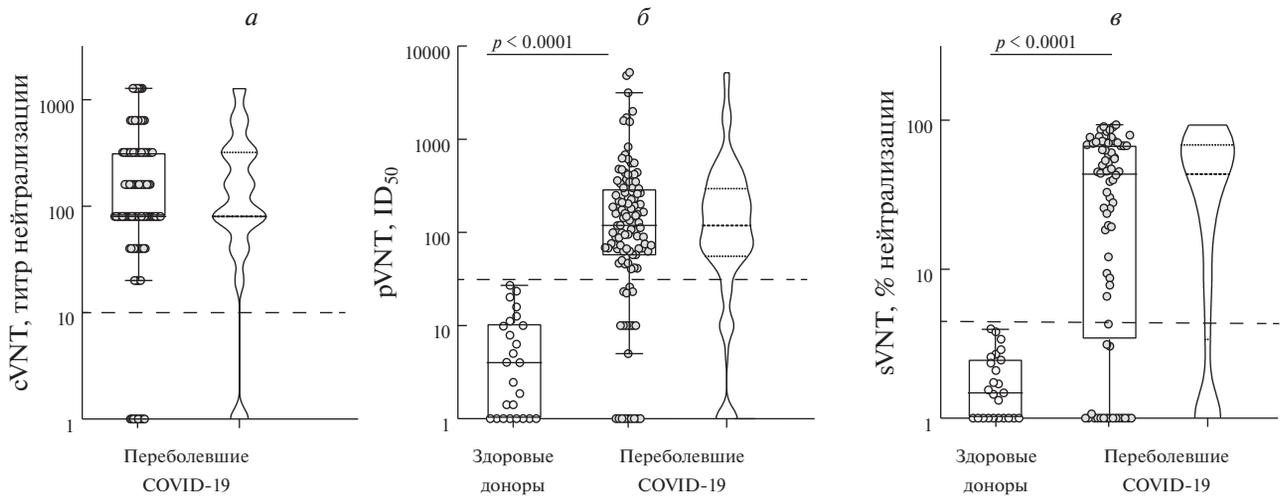


Рис. 2. Распределение уровней вируснейтрализующих антител у пациентов, переболевших COVID-19. Представлены результаты методов cVNT (а), pVNT (б) и sVNT (в). Горизонтальные пунктирные линии обозначают порог отсеечения.

лировал уровень IgG-антител ($r = 0.677, p < 0.0001$; $r = 0.624, p < 0.0001$; $r = 0.615, p < 0.0001$ соответственно). Несколько меньшая корреляция обнаружена между cVNT, pVNT, sVNT и уровнем IgA-антител ($r = 0.63, p < 0.0001$; $r = 0.581, p < 0.0001$; $r = 0.444, p < 0.0001$ соответственно). Наконец, уровень IgM слабо коррелировал с sVNT ($r = 0.367, p = 0.001$) при хорошей корреляции с cVNT и pVNT ($r = 0.671, p < 0.0001$; $r = 0.716, p < 0.0001$ соответственно).

Сравнение результатов, полученных различными модификациями тестов по нейтрализации вируса, представлено на рис. 3б. Как и ожидалось, наиболее высокая корреляция результатов выявлена для cVNT и pVNT ($r = 0.841, p < 0.0001$), несколько слабее – для cVNT и sVNT ($r = 0.643, p < 0.0001$) и pVNT и sVNT ($r = 0.665, p < 0.001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наиболее адекватным подходом к определению вируснейтрализующей активности плазмы считается использование живого вируса, в том числе и SARS-CoV-2. Именно поэтому метод cVNT относится к наиболее точным и информативным, так как позволяет выявлять действие антител, нейтрализующих вирус по различным механизмам [12]. Метод cVNT основан на использовании компетентного к репликации вируса, в связи с чем его проводят в лабораториях с уровнем биобезопасности не ниже BSL3 (по Международной классификации уровня биобезопасности), а это сильно ограничивает его применение. К недостаткам cVNT также можно отнести субъективность при оценке цитопатического эффекта клеток-мишеней и дискретный характер получаемых данных. Если первый недостаток нивелирует-

ся многолетним опытом и квалификацией исследователя, то отсутствие непрерывности получаемых результатов затрудняет их последующий статистический анализ.

Вирусоподобные частицы, псевдотипированные S-белком SARS-CoV-2, хорошо имитируют начальные этапы жизненного цикла вируса: его связывание и слияние с клеткой-мишенью [6]. Метод pVNT значительно проще в исполнении, чем cVNT, и позволяет работать в лабораториях с уровнем биобезопасности BSL2. Вследствие этих обстоятельств pVNT получил широкое распространение в исследовательских лабораториях.

Следует заметить, что как при выполнении cVNT, так и pVNT необходимы живые клетки; кроме того, немаловажный фактор – квалификация исполнителя. В связи с этими ограничениями вышеуказанные методы не получили широкого распространения в клинико-диагностической практике. В качестве дополнительного метода мы использовали так называемый суррогатный вируснейтрализующий тест – sVNT [7]. Его можно отнести к экспресс-тестам, так как он позволяет оценить вируснейтрализующее действие образцов плазмы всего за 1–2 ч, в то время как выполнение cVNT и pVNT занимает несколько суток. К недостаткам sVNT можно отнести ограниченную специфичность: им можно выявить только те антитела, которые работают исключительно по механизму блокировки связывания RBD и ACE2 [7].

Обращает на себя внимание, что у небольшой доли реконвалесцентов практически отсутствовали вируснейтрализующие антитела. Это наблюдение согласуется с ранее опубликованными данными о том, что 2% выздоровевших после COVID-19 пациентов не продуцируют нейтрализующие антитела [13]. Характерно, что наиболь-

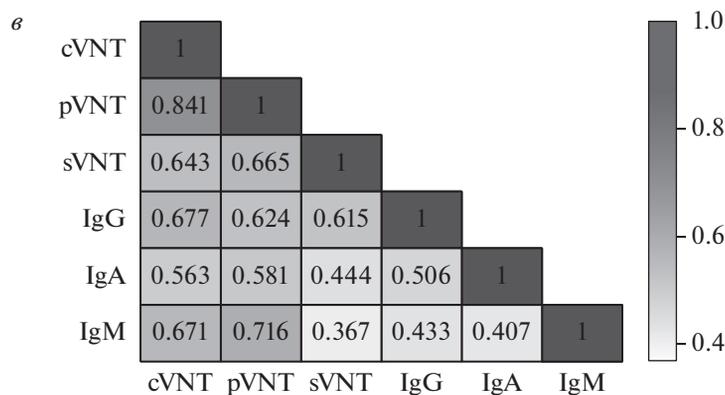
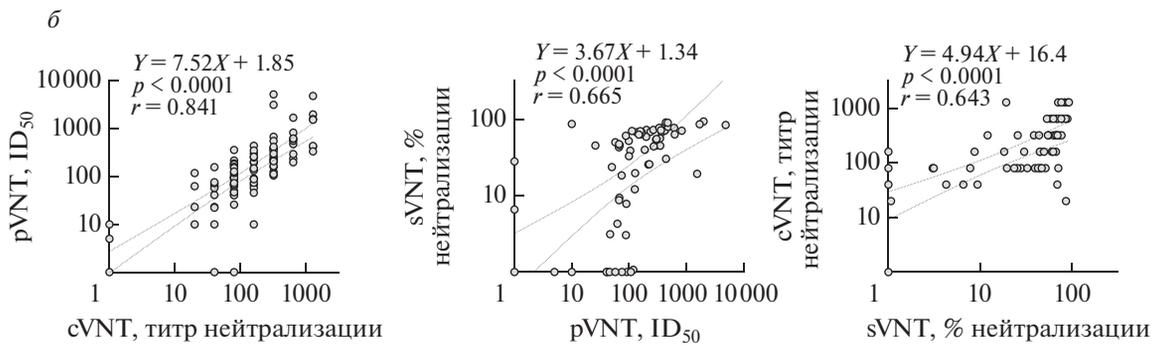
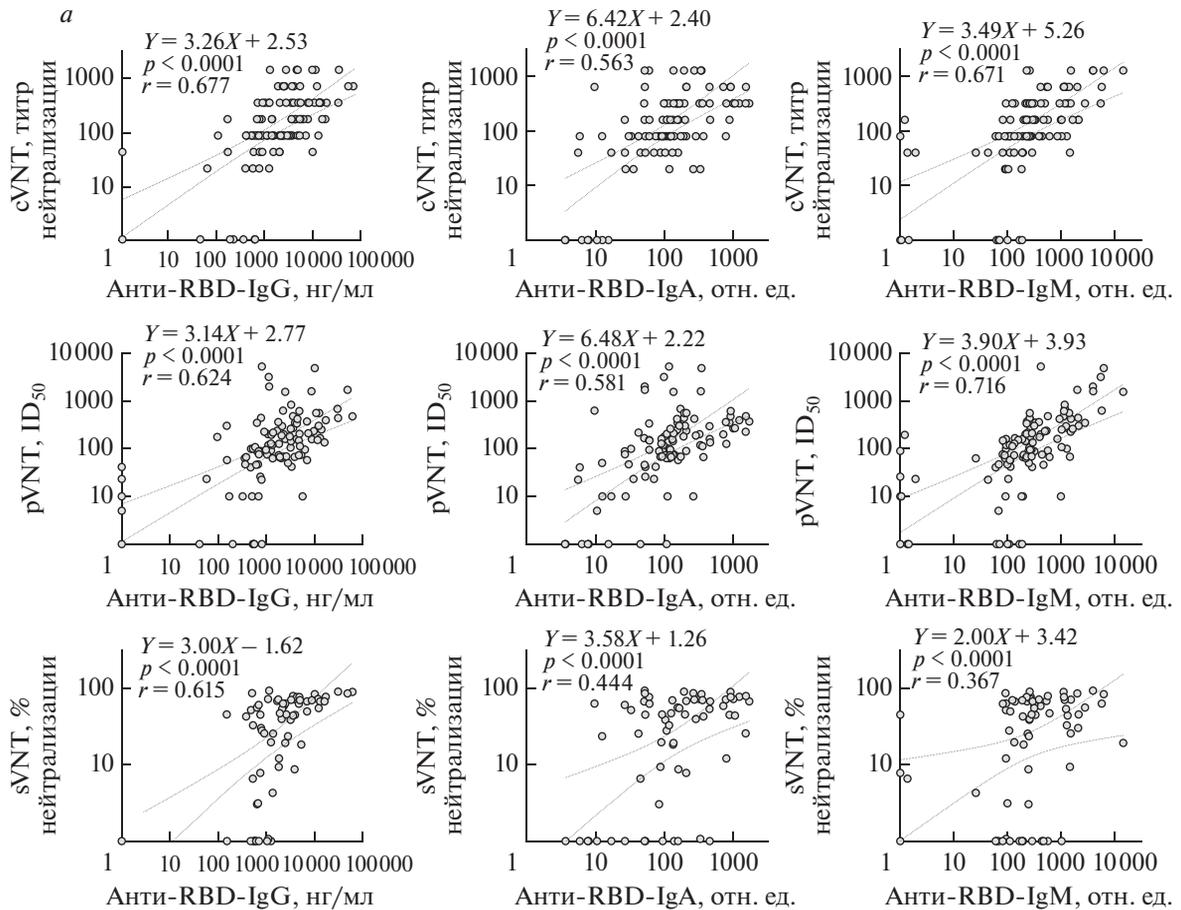


Рис. 3. Корреляционный анализ активности образцов плазмы реконвалесцентов. *a* – Сравнение результатов тестов по нейтрализации вируса: *cVNT*, *pVNT* и *sVNT* – с данными по определению *IgG*-, *IgA*- и *IgM*-антител против *RBD*. *б* – Сравнение результатов тестов по нейтрализации вируса: *cVNT*, *pVNT* и *sVNT* – между собой. *в* – Тепловая карта коэффициентов корреляции по Спирмену. Прямыми представлены линии тренда линейной регрессии. На субпанелях цифрами указаны коэффициенты линейной регрессии, а также ранговой корреляции по Спирмену (*r*). Отклики с низкими значениями при представлении на логарифмических шкалах принимали равными 1.

шее число таких пациентов ($n = 23$) выявлено при использовании *sVNT* – теста, который детектирует только *RBD*-нейтрализующие антитела. Можно предположить, что некоторые образцы плазмы этой группы переболевших содержали нейтрализующие антитела, которые связываются с *S*-белком вне области *RBD* [14]. Действительно, ранее показано, что антитела к *N*-концевому домену или *S2*-области *S*-белка также могут участвовать в нейтрализации вируса [15].

Несмотря на отмеченные отличия, выявленные нами, а также в некоторых других исследованиях, различные варианты методов нейтрализации вируса хорошо коррелируют между собой [16–18]. Наиболее высокий коэффициент корреляции выявлен между значениями, полученными в тестах *cVNT* и *pVNT* ($r = 0.841$). Это означает, что тест *cVNT* в большинстве случаев может быть заменен тестом *pVNT* при оценке *SARS-CoV-2*-нейтрализующей активности антител в плазме доноров. С определенными оговорками все три теста могут быть использованы для оценки нейтрализующей активности образцов плазмы. Сравнение результатов по вируснейтрализующей активности и содержанию *RBD*-специфичных антител позволяет оценить вклад различных изоформ в нейтрализующую способность конкретного образца плазмы. В каждом из использованных тестов нейтрализации наиболее высокие коэффициенты корреляции получены для антител *IgG*. Это указывает на превалирующую роль антител *IgG*, а не *IgM* и *IgA* при блокировке взаимодействия *RBD* вируса с его рецептором – *ACE2*. Интересно сравнить полученные результаты с опубликованными данными для других групп реконвалесцентов, а также для появляющихся вариантов *SARS-CoV-2*.

Заметим, что недавно наши соотечественники, *D. Kolesov* и соавт. [14], опубликовали работу, близкую к представленной здесь. Их исследование выполнено тоже на московской популяции и с участием пациентов, переболевших Уханьским или близкими вариантами *SARS-CoV-2* [14]. Однако в проведенном нами исследовании получены более низкие коэффициенты корреляции между результатами *cVNT*, *sVNT* и анти-*RBD*-теста. Возможно, это связано с различными форматами *sVNT*. Можно также отметить, что полученный нами коэффициент корреляции между *sVNT* и анти-*RBD*-тестом сравним с таковым для вакцинированных лиц [17].

На достаточно большой и разнородной выборке образцов плазмы реконвалесцентов нами обнаружена их высокая гетерогенность. Наибольшее внимание привлекают образцы с высокой вируснейтрализующей активностью – титры превышали 1000 в *cVNT*, а значения ID_{50} были выше 1000 в *pVNT*. Эти образцы плазмы можно отнести к наиболее перспективным для последующей трансфузии пациентам в острой фазе *COVID-19*. В процентном выражении доля таких образцов невелика (не более 5%). В выборке преобладали образцы плазмы с умеренным количеством вируснейтрализующих антител (титры в диапазоне от 90 до 300 в *cVNT* и значения ID_{50} в диапазоне от 100 до 1000 в *pVNT*). Ранее предполагалось, что гетерогенность по вируснейтрализующей активности плазмы/сыворотки крови среди переболевших *COVID-19* может быть связана с тяжестью перенесенного заболевания [19, 20], а также с разными сроками взятия образцов. Вариабельность вируснейтрализующей активности образцов плазмы наиболее отчетливо проявлялась при сравнении различных мутантных вариантов *SARS-CoV-2* [16]. Низкая вируснейтрализующая активность плазмы/сыворотки крови у некоторых переболевших *COVID-19* может быть одной из причин повторного заражения [21].

Таким образом, сравнение тестов по оценке вируснейтрализующей активности образцов плазмы реконвалесцентов *COVID-19* позволяет не только ответить на вопрос о взаимной заменимости того или иного теста, но также выявить образцы, в которых содержатся антитела против *SARS-CoV-2*, работающие по разным механизмам нейтрализации. Представляется важным использование подобных тест-систем для предварительного отбора доноров для сортировки единичных *SARS-CoV-2*-специфичных *B*-лимфоцитов – с целью получения человеческих моноклональных вируснейтрализующих антител.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1086, контракт RF–193021X0015, 15.ИП.21.0015).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование

участников было получено информированное добровольное согласие. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФНКЦ ФМБА России (протокол заседания № 4 от 28.04.2020).

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Qi H., Liu B., Wang X., Zhang L. (2022) The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. *Nat. Immunol.* **23**(7), 1008–1020. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01248-5>
- Premkumar L., Segovia-Chumbez B., Jadi R., Martinez D.R., Raut R., Markmann A., Cornaby C., Bartelt L., Weiss S., Park Y., Edwards C.E., Weimer E., Scherer E.M., Roupheal N., Edupuganti S., Weiskopf D., Tse L.V., Hou Y.J., Margolis D., Sette A., de Silva A.M. (2020) The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* **5**(48), eabc8413.
- Cromer D., Steain M., Reynaldi A., Schlub T.E., Wheatley A.K., Juno J.A., Kent S.J., Triccas J.A., Khoury D.S., Davenport M.P. (2022) Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting: a meta-analysis. *Lancet Microbe.* **3**(1), e52–e61.
- Khoury D.S., Cromer D., Reynaldi A., Schlub T.E., Wheatley A.K., Juno J.A., Subbarao K., Kent S.J., Triccas J.A., Davenport M.P. (2021) Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.* **27**(7), 1205–1211.
- Баклаушев В.П., Аверьянов А.В., Сотникова А.Г., Перкина А.С., Иванов А.В., Юсубалиева Г.М., Новикова О.Н., Шикина В.Е., Дупик Н.В., Кедрова А.Г., Санжаров А.Е., Ширишова Е.В., Балионис О.И., Валуев-Эллистон В.Т., Закирова Н.Ф., Глазов Я.Н., Панюхина И.А., Соловьёв Н.А., Винокуров А.Г., Иванов Ю.В., Васильев В.Н., Клыпа Т.В., Троицкий А.В. (2020) Предварительные итоги исследования безопасности и эффективности плазмы реконвалесцентов в терапии COVID-19. *Клиническая практика.* **11**(2), 38–50.
- Bewley K.R., Coombes N.S., Gagnon L., McInroy L., Baker N., Shaik I., St-Jean J.R., St-Amant N., Buttigieg K.R., Humphries H.E., Godwin K.J., Brunt E., Allen L., Leung S., Brown P.J., Penn E.J., Thomas K., Kulnis G., Hallis B., Carroll M., Charlton S. (2021) Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, micro-neutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nat. Protoc.* **16**(6), 3114–3140.
- Tan C.W., Chia W.N., Qin X., Liu P., Chen M.I., Tiu C., Hu Z., Chen V.C., Young B.E., Sia W.R., Tan Y.J., Foo R., Yi Y., Lye D.C., Anderson D.E., Wang L.F. (2020) A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein–protein interaction. *Nat. Biotechnol.* **38**(9), 1073–1078.
- Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Gusel'nikov S.V., Baranov K.O., Belovezhets T.N., Mechetina L.V., Volkova O.Y., Najakshin A.M., Chikaev N.A., Chikaev A.N., Solodkov P.P., Larichev V.F., Gulyaeva M.A., Markhaev A.G., Kononova Y.V., Alekseyev A.Y., Shestopalov A.M., Yusubaliev G.M., Klypa T.V., Ivanov A.V., Taranin A.V. (2021) Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern. *Cell Discov.* **7**(1), 96.
- Gushchin V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., Odintsova A.S., Siniavin A.E., Nikiforova M.A., Pochtovyi A.A., Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Burgasova O.A., Kolobukhina L.V., Iliukhina A.A., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Kuzina A.V., Grousova D.M., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Karpova O.V., Gintsburg A.L. (2021) Neutralizing activity of sera from Sputnik V-vaccinated people against variants of concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow endemic SARS-CoV-2 variants. *Vaccines (Basel).* **9**(7), 779.
- Komissarov A.B., Safina K.R., Garushyants S.K., Fadeev A.V., Sergeeva M.V., Ivanova A.A., Danilenko D.M., Lioznov D., Shneider O.V., Shvyrev N., Spirin V., Glyzin D., Shchur V., Bazykin G.A. (2021) Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia. *Nat. Commun.* **12**(1), 649.
- Matsvay A., Klink G.V., Safina K.R., Nabieva E., Garushyants S.K., Biba D., Bazykin G.A., Mikhaylov I.M., Say A.V., Zakamornaya A.I., Khakhina A.O., Lisitsa T.S., Ayginin A.A., Abramov I.S., Bogdan S.A., Kolbutova K.B., Oleynikova D.U., Avdeenko T.F., Shipulin G.A., Yudin S.M., Skvortsova V.I. (2021) Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 in Russia reveals recurring cross-border transmission throughout 2020. *medRxiv.* 2021, <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.21254115>
- Saade C., Gonzalez C., Bal A., Valette M., Saker K., Lina B., Josset L., Trabaud M.A., Thiery G., Botelho-Nevers E., Paul S., Verhoeven P., Bourlet T., Pillot S., Morfin F., Trouillet-Assant S., Pozzetto B. (2021) Live virus neutralization testing in convalescent patients and subjects vaccinated against 19A, 20B, 20I/501Y.V1 and 20H/501Y.V2 isolates of SARS-CoV-2. *Emerg. Microbes Infect.* **10**(1), 1499–1502.
- Fafi-Kremer S., Bruel T., Madec Y., Grant R., Tondeur L., Grzelak L., Staropoli I., Anna F., Souque P., Fernandes-Pellerin S., Jolly N., Renaudat C., Ungeheuer M.N., Schmidt-Mutter C., Collongues N., Bolle A., Velay A., Lefebvre N., Mielcarek M., Meyer N., Fontanet A. (2020) Serologic responses to SARS-CoV-2 infection among hospital staff with mild disease in eastern France. *EBioMedicine.* **59**, 102915.
- Kolesov D.E., Sinegubova M.V., Dayanova L.K., Dolzhikova I.V., Vorobiev I.I., Orlova N.A. (2022) Fast and accurate surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blocking of the interaction of ACE2 and SARS-CoV-2 spike protein RBD. *Diagnostics (Basel).* **12**(2), 393.
- Jiang S., Hillyer C., Du L. (2020) Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends Immunol.* **41**(5), 355–359.
- Jaafar R., Boschi C., Aherfi S., Bancod A., Le Bideau M., Edouard S., Colson P., Chahinian H., Raoult D.,

- Yahi N., Fantini J., La Scola B. (2021) High individual heterogeneity of neutralizing activities against the original strain and nine different variants of SARS-CoV-2. *Viruses*. **13**(11), 2177.
17. Krüttgen A., Lauen M., Klingel H., Imöhl M., Kleines M. (2022) Two novel SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization assays are suitable for assessing successful immunization with mRNA-1273. *J. Virol. Methods*. **299**, 114297.
18. Wisniewski A.V., Liu J., Lucas C., Klein J., Iwasaki A., Cantley L., Fazen L., Campillo Luna J., Slade M., Redlich C.A. (2022) Development and utilization of a surrogate SARS-CoV-2 viral neutralization assay to assess mRNA vaccine responses. *PLoS One*. **17**(1), e0262657.
19. Chen X., Pan Z., Yue S., Yu F., Zhang J., Yang Y., Li R., Liu B., Yang X., Gao L., Li Z., Lin Y., Huang Q., Xu L., Tang J., Hu L., Zhao J., Liu P., Zhang G., Chen Y., Ye L. (2020) Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal. Transduct. Target. Ther.* **5**(1), 180.
20. Legros V., Denolly S., Vogrig M., Boson B., Siret E., Rigail J., Pillet S., Grattard F., Gonzalo S., Verhoeven P., Allatif O., Berthelot P., Péliissier C., Thiery G., Botelho-Nevers E., Millet G., Morel J., Paul S., Walzer T., Cosset F.L., Pozzetto B. (2021) A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity. *Cell. Mol. Immunol.* **18**(2), 318–327.
21. Gallais F., Gantner P., Bruel T., Velay A., Planas D., Wendling M.J., Bayer S., Solis M., Laugel E., Reix N., Schneider A., Gladly L., Panaget B., Collongues N., Partisani M., Lessinger J. M., Fontanet A., Rey D., Hansmann Y., Kling-Pillitteri L., Fafi-Kremer S. (2021) Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. *EBioMedicine*. **71**, 103561.

HIGH HETEROGENEITY OF VIRUS-NEUTRALIZING AND RBD-BINDING ACTIVITIES OF COVID-19 CONVALESCENT SERA

E. A. Astakhova^{1, 2}, M. G. Byazrova^{1, 2, 3}, G. M. Yusubaliev⁴, V. F. Larichev⁵,
V. P. Baklaushev⁴, and A. V. Filatov^{1, 2, *}

¹National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, 115522 Russia

²Immunology Department, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

³Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), Ministry of Science and Higher Education of Russia, Moscow, 117198 Russia

⁴Federal Research and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, 115682 Russia

⁵Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

*e-mail: avfilat@yandex.ru

An important immunological characteristic of donors who recovered from COVID-19, as well as vaccinated individuals, are the parameters of the humoral response. The analysis of the level of virus-binding antibodies has become widespread. The most accurate predictor of effective immune protection against symptomatic SARS-CoV-2 infection is the activity of virus-neutralizing antibodies. We determined virus-neutralizing activities in plasma samples of individuals ($n = 111$) who had COVID-19 from April to September 2020. Three independent methods were used: conventional with live virus, with virus-like particles pseudotyped with spike protein, and a surrogate virus-neutralization test (cVNT, pVNT and sVNT, respectively). For comparison, the levels of IgG, IgA and IgM antibodies against the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein were also evaluated. The levels of virus-binding as well as virus-neutralizing antibodies in cVNT and pVNT showed high heterogeneity. A comparison of cVNT and pVNT results showed a high correlation, sVNT results also correlated well with both cVNT and pVNT. To the greatest extent, the level of IgG antibodies correlated with the results of cVNT, pVNT and sVNT. The results obtained can be used in the selection of plasmas that are best suited for transfusion and treatment of acute COVID-19. In addition, data on the virus-neutralizing activity of plasma are important for the selection of potential donors, for the isolation of SARS-CoV-2-specific B-lymphocytes in order to further generate human monoclonal virus-neutralizing antibodies.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, virus neutralizing antibodies, human plasma, convalescents

УДК 577.2

ПОЛНАЯ И ЛИШЕННАЯ D-ВОХ ИЗОФОРМЫ PTTG1: ВЛИЯНИЕ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК[#]

© 2022 г. Д. Е. Демин^{a, *}, Е. М. Стасевич^b, М. М. Мурашко^a, Е. А. Ткаченко^{a, c},
А. Н. Уварова^{b, c}, А. М. Шварц^{b, d}

^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Российская академия наук, Москва, 119991 Россия

^bЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Российская академия наук, Москва, 119991 Россия

^cБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

^dМосковский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская область, 141701 Россия

*e-mail: denis.demin@phystech.edu

Поступила в редакцию 15.06.2022 г.

После доработки 03.07.2022 г.

Принята к публикации 05.07.2022 г.

Секурин человека (PTTG1) — это протоонкоген, экспрессия которого повышена во многих типах злокачественных клеток. Ранее нами обнаружена минорная короткая изоформа секурина, лишенная экзонов 3 и 4. Отсутствующие экзоны кодируют основной сайт распознавания (D-бокс) анафазапромотирующим комплексом (APC/C). Нами показано, что эти две изоформы PTTG1 оказывают различное действие на транскрипцию. В представленном исследовании с помощью системы xCELLigence изучено влияние сверхэкспрессии и селективного нокдауна короткой и полной изоформ секурина на пролиферацию клеток. Примечательно, что селективный нокдаун мРНК короткой изоформы приводил к резкому снижению роста клеток, в то время как сверхэкспрессия обеих изоформ ускоряла рост клеток. Для поиска генов с альтернативными изоформами, сходными с секурином, мы провели анализ базы данных GENCODE и обнаружили, что 54 из 128 генов с PTTG1-подобным набором сайтов распознавания APC/C имеют известные изоформы без D-бокса. В целом, полученные данные свидетельствуют о существовании нового класса альтернативных изоформ и подтверждают важность минорных изоформ.

Ключевые слова: PTTG1, секурин, минорная изоформа, онкоген, D-бокс, клеточная пролиферация

DOI: 10.31857/S0026898422060076

Full and D-Box-Deficient PTTG1 Isoforms: Effects on Cell Proliferation

D. E. Demin^{1, *}, E. M. Stasevich², M. M. Murashko¹, E. A. Tkachenko^{1, 3},
A. N. Uvarova^{2, 3}, and A. M. Schwartz^{2, 4}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

³Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

⁴Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

*e-mail: denis.demin@phystech.edu

Human securin (PTTG1) is a protooncogene whose expression is elevated in many types of malignant cells. We previously discovered a minor short isoform of securin lacking exons 3 and 4. The missing exons encode the main recognition site (D-box) of the anaphase-promoting complex (APC/C). We show that these two PTTG1 isoforms have different effects on transcription. Here, we have studied the effects of overexpression and selective knockdown of the short and complete securin isoforms on cell proliferation using the xCELLigence system. Notably, selective knockdown of the short isoform mRNA led to a dramatic decrease in cell growth, while overexpression of both isoforms accelerated cell growth. To search for genes with alternative isoforms similar to securin, we analyzed the GENCODE database and found that 54 of 128 genes with a PTTG1-like set of APC/C recognition sites have known isoforms without the D-box. Overall, the data obtained indicate the existence of a new class of alternative isoforms and reinstates the importance of minor isoforms.

Keywords: PTTG1, securin, minor isoform, oncogene, D-box, cell proliferation

[#] Статья представлена авторами на английском языке.