СОДЕРЖАНИЕ

_

_

Том 55, номер 6, 2021

обзоры

Плазмолипин и его роль в клеточных процессах	
А. А. Шульгин, Т. Д. Лебедев, В. С. Прасолов, П. В. Спирин	883
Противовирусные и противомикробные производные нуклеозидов: структурные особенности и механизмы действия	
А. А. Зенченко, М. С. Дреничев, И. А. Ильичева, С. Н. Михайлов	897
Полногеномные дупликации в эволюции, онтогенезе и патологии: резерв сложности и запаса прочности	
О. В. Анацкая, А. Е. Виноградов	927
ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА	
Разработка мультиплексной ОТ-ПЦР с иммобилизованными праймерами для идентификации возбудителей инфекционной пневмонии человека	
С. А. Лапа, Р. А. Мифтахов, Е. С. Клочихина, Ю. И. Аммур, С. А. Благодатских, В. Е. Шершов, А. С. Заседателев, А. В. Чудинов	944
Риск рассеянного склероза: анализ взаимодействий между вариантами ядерного и митохондриального геномов	
М. С. Козин, И. С. Киселёв, Н. М. Баулина, Г. В. Павлова, А. Н. Бойко, О. Г. Кулакова, О. О. Фаворова	956
Возможная роль гомеодоменсодержащего транскрипционного фактора PREP1 в мезенхимальных клетках сердца	
Ю. С. Стафеев, Е. К. Шевченко, М. А. Болдырева, Д. Н. Пеньков	965
POU2F1(Oct-1) разнонаправленно участвует в ауторегуляции альтернативных промоторов за счет связывания с различными регуляторными участками гена <i>POU2F1</i>	
Е. В. Панкратова, Т. Н. Порцева, А. А. Макарова, Б. М. Льянова, С. Г. Георгиева, А. Г. Степченко	972
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ	
Белковый транс-сплайсинг рекомбинантного стрептавидина на магнетосомах, опосредованный интеином	
S. B. Duan, S. S. Wei, H. M. Wang, S. H. Ding, Y. Z. Chen, J. J. Tian, Y. J. Wang, W. Chen, J. Chen, Q. L. Meng	982
Иммуногенные свойства ДНК-конструкции, кодирующей рецепторсвязывающий домен белка шипа SARS-CoV-2	
М.Б.Боргоякова, Л.И.Карпенко, А.П.Рудомётов, Д.В.Шаньшин, А.А.Исаева, В.С.Несмеянова, Н.В.Волкова, С.В.Беленькая, Д.Е.Мурашкин, Д.Н.Щербаков, Е.А.Волосникова, Е.В.Старостина, Л.А.Орлова, Н.В.Данильченко, А.В.Зайковская, О.В.Пьянков, А.А.Ильичёв	987
Упаковка молекул ДНК субхромосомного размера в хроматиновых тельцах макронуклеусов инфузорий	
О. Г. Леонова, А. А. Потехин, И. В. Некрасова, Б. П. Караджян, Б. В. Сёмин, В. С. Прасолов, В. И. Попенко	999

Сыворотки мышей, иммунизированных металлопротеиназой МТ1-ММР, снижают миграционный потенциал клеток рака поджелудочной железы	
Н. А. Митькин, А. С. Устюгова, А. Н. Уварова, К. А. Румянцев, К. В. Корнеев, В. В. Павшинцев	1011
При инициации долговременной потенциации в нейрональной культуре субъединица PHF10 ремоделирующего хроматин комплекса PBAF меняет свою локализацию и взаимодействует с с-FOS	
А. М. Азиева, А. А. Шейнов, Д. А. Кириллова, Е. В. Татарский, С. Г. Георгиева, Н. В. Сошникова	1021
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫИ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ Расчет энергии формирования дуплексов РНК/РНК и ДНК/РНК на основании метода молекулярной динамики	
В. М. Голышев, Д. В. Пышный, А. А. Ломзов	1030
БИОИНФОРМАТИКА	
miRNA-16 как внутренний контроль в исследованиях рака молочной железы: систематический обзор и мета-анализ	
H. N. N. Thu, H. T. N. Vy, T. N. N. Thanh, D. T. N. Giang, T. N. Nhan, N. P. Hoang, T. N. Hue	1045

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 577.2:616;577.2;579

ПЛАЗМОЛИПИН И ЕГО РОЛЬ В КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССАХ

© 2021 г. А. А. Шульгин^{а, b,} *, Т. Д. Лебедев^а, В. С. Прасолов^а, П. В. Спирин^а

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия ^bМосковский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

*e-mail: ashu69@mail.ru

Поступила в редакцию 04.03.2021 г. После доработки 26.03.2021 г. Принята к публикации 05.04.2021 г.

Изучение механизмов возникновения и развития онкологических и нейродегенеративных заболеваний представляет важное направление современной биомедицины. В прогнозировании течения заболеваний и разработке эффективных методов борьбы с ними существенная роль принадлежит молекулярным маркерам, связанным с перестройкой внутриклеточной сигнализации. Таким маркером может быть протеолипид плазмолипин — один из основных компонентов миелиновой оболочки, участвующий в формировании и нормальном функционировании нервной системы. Плазмолипин вовлечен во внутриклеточный транспорт, формирование липидных рафтов и Notch-сигнализацию. Полагают, что плазмолипин может участвовать в развитии целого ряда патологий, включая онкозаболевания, шизофрению, болезнь Альцгеймера, сахарный диабет типа 2. Плазмолипин и его гомологи рассматривают в качестве клеточных рецепторов, необходимых для проникновения некоторых вирусов в клетку. В представленном обзоре обобщены данные о структуре плазмолипина, его функциях в нормальных клетках и при патологических нарушениях.

Ключевые слова: протеолипиды, нейродегенеративные заболевания, Notch-сигнализация, SNARE, MARVEL, внутриклеточный транспорт, липидные рафты, ионные каналы DOI: 10.31857/S0026898421060112

введение

В начале 1950-х годов в нормальных и опухолевых тканях мозга обнаружили протеолипиды – новый класс белково-липидных соединений, нерастворимых в воде, но способных растворяться в хлороформ-метанольной смеси [1]. Протеолипидный белок (PLP) входит в состав первого из основных протеолипидов, выделенных из клеток, формирующих миелиновую оболочку, имеет молекулярную массу 30 кДа и составляет примерно 10-30% общего белка миелина [2, 3]. PLP обладает гидрофобными свойствами, способен к гомодимеризации и взаимодействию с мембранными липидами [4]. Протеолипиды входят в состав растительных, животных и бактериальных клеток, а также являются одним из основных компонентов миелина центральной и периферической нервной системы (ШНС и ПНС соответственно). Высокое содержание гидрофобных аминокислотных остатков определяет существенную роль протеолипидов в поддержании структуры липидного бислоя мембран [5-7]. Олигомеризация протеолипидов способствует образованию ион-проводящих трансмембранных пор, активность которых может обеспечиваться конформационными изменениями протеолипидов. Подобные поры обнаружены на митохондриальных и бактериальных мембранах [8, 9].

Впервые протеолипид плазмолипин (PLLP) выделили в 1981 году из плазматических мембран клеток почки быка. Гетеродимерный PLLP был назван протеолипидным комплексом плазматической мембраны клеток почки (PMPLP) [10, 11]. Показано, что внесение PMPLP в липидный бислой вызывает формирование катион-селективных К⁺ и Na⁺-каналов. К формированию этих каналов, как оказалось, приводит олигомеризация трех комплексов PMPLP, что позволило предложить модель пространственной структуры канала (рис. 1) [10-12]. Достоверных сведений о существовании таких каналов *in vivo* нет, однако выявлена обратная корреляция между экспрессией PLLP и степенью проводимости плазматических мембран культивируемых клеток для ионов К⁺. Более того, в аминокислотной последовательности PLLP не найдено значительной гомологии с известными К⁺ -каналами [13, 14].

Позднее показали, что PMPLP входит в состав синаптических плазматических мембран, а также миелиновых оболочек. PMPLP синтезирует-



Рис. 1. Схематическое изображение модели ионного канала, представленного тримером комплексов PMPLP. Трансмембранные сегменты III и IV выстилают стенки канала благодаря присутствию большого количества гидроксильных групп.

ся на гранулярном эндоплазматическом ретикулуме (RER) и не подвергается значительным посттрансляционным модификациям в процессе созревания [15–17]. Изначально плазмолипином назвали гетеродимер PMPLP, однако в дальнейшем было показано, что субъединицы данного комплекса идентичны и кодируются одним геном [13, 16, 18]. В настоящий момент термин плазмолипин относится к мономерному продукту гена *PLLP* [13].

СТРУКТУРА ПЛАЗМОЛИПИНА

Ген *hPLLP* человека, локализованный на длинном плече хромосомы 16 (16q13), содержит четыре экзона и большой первый интрон (рис. 2), что свойственно структуре генов, кодирующих белки с четырьмя трансмембранными доменами (TM). Ген *PLLP* человека состоит примерно из 28.5 т.п.н. Экзон I и часть экзона II кодируют первый TM, а экзоны II, III и IV кодируют домены II, III и IV соответственно. Ген *pllp* мыши имеет сходную структуру, но он более короткий (около 19 т.п.н.). Сравнение кДНК мыши и крысы с кДНК человека выявило высокую степень гомологии нуклеотидных последовательностей в кодирующих областях (93.7 и 86% соответственно) [21–23].

Ген *PLLP* содержит два сайта инициации транскрипции (ATG) и область из 546 п.н., кодирующую полипептид из 182 аминокислотных остатков с высоким содержанием гидрофобных аминокислот (72%) и молекулярной массой порядка 19.4 кДа [13, 16]. Большой процент гидрофобных остатков способствует формированию вторичной структуры с высоким содержанием α-спиралей (примерно 70%), образующих четыре гидрофобные области (I-IV) длиной 20-25 аминокислотных остатков. В третичной структуре эти области представлены ТМ, связанными между собой короткими гидрофильными внемембранными неструктурированными участками [16]. С помощью биоинформатического алгоритма PHDhtm [19] получена модель третичной структуры белка (рис. 2), согласно которой PLLP может иметь два сайта фосфорилирования (Ser9 и Ser130) [13]. Расчет конформации PLLP с помощью компьютерного моделирования позволил предсказать возможность ступенчатого расположения ТМ в гидрофобной среде (рис. 3) [20]. Гидрофильные участки между ТМ І и ІІ, а также между ІІІ и ІV содержат остатки пролина, способствующие сближению и компактизации данных доменов. Гидроксильные группы в ТМ III и IV могут способствовать формированию стенок ионного канала. Предполагается, что N- и C-концы данного протеолипида ориентированы в сторону цитоплазмы. При этом на N-конце отсутствует сигнальный пептид, что свойственно таким трансмембранным белкам миелина, как коннексин 32 (Сх32), миелиновый и лимфоцитарный белок крысы (rMAL), периферический белок миелина 22 кДа (PMP22) и PLP [16].

ГОМОЛОГИ ПЛАЗМОЛИПИНА

Анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в базах данных GenBank и PIR, позволил выявить значительное число частичных гомологов PLLP на уровне аминокислотной последовательности. Установлено, что аминокислотная последовательность TM PLLP обладает частичной гомологией (более 20%) с TM некоторых мембранных транспортных белков. Выявлена 50%-ная идентичность между II TM PLLP и вторым TM белков rMAL и hMAL Кроме того, PLLP обладает структурной гомологией с rMAL, PMP22, PLP, Сх32 и другими белками, участвующими в миелинизации, которые относятся к классу тетраспановых белков миелиновой оболочки [13, 16, 21, 24].

Высокогидрофобный белок MAL — один из наиболее близких гомологов PLLP [25]. rMAL активно синтезируется в миелинизирующих олигодендроцитах и играет важную роль во внутриклеточном транспорте и сортинге белков. rMAL синтезируется в селезенке, почках, мозге и седалищном нерве [26, 27]. Показано, что белок cMAL, выделенный из почки собаки, *in vitro* включается в мембранные микродомены (GEM), обогащенные гликосфинголипидами и холестерином, а также входит в



Рис. 2. Схематическое изображение структуры и локализации гена *hPLLP*. Экзоны указаны римскими цифрами. Нетранслруемые участки в экзонах выделены светло-голубым.

состав транспортных везикул. Белок cMAL локализуется на апикальной поверхности клеток эпителия и непрерывно перемещается между *транс*-Гольджи-сетью, плазматической мембраной и эндосомами. Подавление экспрессии эндогенного сMAL в клетках почки собаки Madin-Darby (MD-CK) с помощью антисмысловых олигонуклеотидов приводит к нарушению апикального транспорта мембранных и секреторных белков [28–30]. Общая идентичность аминокислотных последовательностей MAL и PLLP составляет 29%, при этом все белки семейства MAL и PLLP имеют общую консервативную последовательность [(Q,Y)GWVM(F,Y)V(S,A)(V,L)], что позволяет отнести PLLP к этому семейству [26, 31, 32].

Значительное число родственных MAL белков, ассоциированных с везикулярным транспортом и мембранными взаимодействиями, содержат общий домен MARVEL (MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link). Все белки с этим доменом имеют M-образную топологию (четыре спиральных TM с цитоплазматиче-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

скими N- и C-концами). Высоко консервативный домен MARVEL имеет древнее эволюционное происхождение. Этот домен обнаружен у представителей различных таксономических групп, в частности у *Caenorhabditis elgans* и *Drosophila melanogaster* [32]. Белки семейства MARVEL участвуют в везикулярном транспорте и в формировании плотных контактов. Показано, что PLLP содержит этот домен, что косвенно может указывать на сходство функций PLLP и других белков, содержащих MARVEL [20, 32–37].

ТКАНЕСПЕЦФИЧНОСТЬ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПЛАЗМОЛИПИНА

Экспрессия PLLP характерна для клеток, формирующих нервную систему, желудочно-кишечный тракт (желудок, пищевод и толстая кишка), почки, а также клеток сердечной и скелетных мышц, легких, тимуса, яичников и яичек. Экспрессия *PLLP* обнаружена в клетках надпочечников,



Рис. 3. Схематическое изображение третичной структуры PLLP (два сайта фосфорилирования Ser9 и Ser130 выделены большими кругами) и ступенчатого расположения его трансмембранных спиралей.

околоушной, подчелюстной, куперовой, предстательной и щитовидной желез [13, 16, 21, 38]. Наиболее высокий уровень PLLP наблюдается в эпителиальных клетках и клетках ЦНС и ПНС. Относительно высокий уровень PLLP обнаружен в эпителиальных клетках люминальной стороны канальцев нефронов коркового вещества почки и в клетках люминальной стороны собирательных канальцев мозгового вещества почки. Белок PLLP обнаружен на апикальной поверхности клеток железистого эпителия различных отделов желудка, а именно, в области свода, ямках желудка и в привратнике [21, 38]. Высокое содержание PLLP отмечено в белом веществе спинного мозга, в компактном миелине периферических нервов, образованном шванновскими клетками, а также в олигодендроцитах, формирующих миелиновую оболочку сигнальных путей ЦНС [13, 16, 21, 38]. Области головного мозга, наиболее богатые белым веществом, как правило, содержат больше PLLP. Изучение коронарных срезов переднего отдела мозга взрослой крысы выявило значительное количество PLLP в миелине колена мозолистого тела, хвостатого ядра, в передней части передней комиссуры, а также в обонятельном и зрительном нервах. В заднем отделе мозга высокие уровни PLLP обнаружены в пирамидном пути, в путях задней части ретикулярного ядра, в верхних ножках и белом веществе мозжечка. Относительно небольшие количества PLLP найдены в телах нейронов неокортекса, а также в клетках гранулярных и пирамидных слоев гиппокампа. Существенно, что экспрессия PLLP не обнаружена в нейронах мозжечка и спинного мозга, в менингеальных фибробластах, в протоплазматических астроцитах и клетках сосудистых сплетений желудочков мозга [13, 18, 21, 24, 38, 39]. Исследование белковых фракций, полученных из седалищного нерва крысы, указывает на присутствие PLLP во фракциях, связанных с компактным миелином, некомпактным миелином (надрезы Шмидта–Лантермана), аксолеммой и периаксолеммой (параузловые петли) [39–42].

Показано, что PLLP локазизован преимущественно на апикальных мембранах поляризованных клеток, хотя незначительные количества белка обнаружены и на базолатеральных мембранах. Первичная сегрегация PLLP, как и его гомолога MAL, в обогащенные гликосфинголипидами и холестерином липидные рафты в *транс*-Гольджи предшествует его транспорту к апикальным и базолатеральным поверхностям клетки [38, 42–45]. К плазматической мембране PLLP поступает по микротрубочкам в везикулах, образованных из этих рафтов [42, 43]. Экспонированный на поверхности клеток PLLP может подвергаться эндоцитозу с формированием окаймленных везикул и обратному транспорту в сеть Гольджи и другие компартменты клетки. Таким образом, в клетках происходит постоянная рециркуляция PLLP [42, 46, 47, 62].

РОЛЬ ПЛАЗМОЛИПИНА В РАЗВИТИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

При изучении онтогенеза головного мозга крысы обнаружили две изоформы PLLP – эмбриональную и постнатальную, имеющие разную молекулярную массу. Эмбриональная изоформа, как следует из ее названия, наиболее активно синтезируется в процессе пренатального нейрогенеза крысы. В частности, это связывают с дифференцировкой эмбриональных предшественников нейронов. Снижение общего количества эмбриональной формы характерно для окончания перинатального периода, а полное исчезновение наблюдается к концу первой постнатальной недели. Уровень экспрессии PLLP в пренатальный период незначителен, а его резкое увеличение в период с первой по третью постнатальнную неделю коррелирует с активной фазой миелинизации нервных волокон [43, 49]. При этом отмечено существенное преобладание фосфорилированного PLLP в белковых фракциях, полученных из очищенных миелиновых оболочек седалищного нерва молодых крыс (постнатальные 2-3 недели) по сравнению со взрослыми крысами [13, 38]. Индукция дифференцировки клеток нейробластомы NB2a сопровождается активацией синтеза эмбриональной изоформы PLLP. Показано, что повышение синтеза этой изоформы коррелирует с увеличением числа и длины нейритов, характерным для активной фазы дифференцировки. Снижение скорости образования и удлинения нейритов, наблюдаемое на поздних фазах дифференцировки клеток NB2a, совпадает с резким снижением синтеза и уменьшением общего количества эмбрионального PLLP [50].

PLLP, как и многие белки, содержащие домен MARVEL, может формировать олигомеры с помощью мотивов ØxxØ (х – любой аминокислотный остаток, Ø – аминокислота с неполярным радикалом, например, L/M/F/I/V), облегчающих спираль-спиральные взаимодействия [20, 51]. Олигомеризация PLLP и стабилизация его конформации требуют привлечения холестерина и сфинголипидов, что опосредует синтез жидкокристаллических мембранных доменов высокой вязкости – основных компонентов миелиновых мембран. Это указывает на важную роль PLLP в биогенезе миелиновых мембран и миелинизации [20, 38, 42, 51]. Показано, что созревание олигодендроцитов мыши коррелирует с повышением синтеза PLLP и сопровождается формированием плоских мембран и сети отростков. При этом наблюдается частичное изменение локализации

PLLP от тела клетки к ее отросткам и в область плоских мембран [24]. В культуре шванновских клеток PLLP находится преимущественно в комплексе Гольджи, что установлено по его колокализации с маркером комплекса Гольджи — белком pl15. Совместное культивирование этих клеток с нейронами приводит к изменению локализации PLLP в шванновских клетках в области богатого белками-маркерами компактного (MBP — основной белок миелина) и некомпактного миелина (MAG — гликопротеин, ассоциированный с миелином) [42].

PLLP может участвовать в механизмах, ассоциированных с регенерацией нервов после повреждения. При этом обнаружена прямая корреляция между интенсивностью ремиелинизации и количеством мPHK и белка PLLP в области регенерации [13, 38].

Известно, что нормальное формирование миелиновой оболочки связано с регуляцией динамики ионов и жидкости в шванновских клетках и олигодендроцитах. Локализация PLLP в области параузловых петель может быть сопряжена с этими процессами [40]. Кроме того, локализация PLLP в окаймленных везикулах и его присутствие на синаптических мембранах могут указывать на участие PLLP в быстром аксонном транспорте белков [46, 48].

РОЛЬ ПЛАЗМОЛИПИНА В МОРФОГЕНЕЗЕ КИШЕЧНИКА

Изучение морфогенеза аквариумной рыбки Danio rerio показало, что PLLP может принимать активное участие в развитии кишечника. Установлено, что экспрессия гена PLLP в клетках заднего сегмента средней кишки повышается при формировании и расширении ее просвета у личинок. Через 5 сут после оплодотворения PLLP накапливается в апикальных областях эпителиальных клеток формируемого кишечника. При этом большая часть PLLP находится в канальцах и везикулах, лежащих чуть ниже апикальной плазматической мембраны. Относительно небольшое его количество обнаружено в апикальных микроворсинках и базальных эндосомах. Субапикальное расположение PLLP может указывать на его участие в рециркуляции и сортировке белковых молекул в области плазматической мембраны, осуществляемых при участии апикальных рециркулирующих эндосом (ARE). Это подтверждено колокализацией PLLP с белком Rab11 (маркер ARE). Rab11 входит в семейство малых GTPa3 Rab, которые активно участвуют в различных этапах внутриклеточного транспорта и служат маркерами разных внутриклеточных мембранных структур [52-54]. Высокая представленность PLLP в клетках, обогащенных белком Lamp2, специфическим маркером лизосом, указывает на то, что PLLP может служить маркером энтероцитов заднего сегмента средней кишки на начальных этапах дифференцировки кишечника [62–64].

Введение инактивирующей мутации в ген *pllp* (*pllp^{pd111}*) *D. rerio* вызывает неправильное распределение Rab11 в цитоплазме эпителиальных клеток задней кишки, что указывает на принципиальное участие PLLP в нормальном функционировании апикальных рециркулирующих эндосом. Существенно, что нокаут PLLP не приводил к изменению строения кишечника в период его раннего развития, однако значительно снижал количество клеток, способных к активному эндоцитозу и поглощению питательных веществ из просвета кишечника. В этих клетках наблюдалось уменьшение размера и количества апикальных эндосом, а также длины апикальных микроворсинок. Мутация *pllp^{pd111}* приводит к нарушению складчатости кишечника на поздних этапах его формирования, значительному разрастанию апикальных мембран клеток кишечного эпителия, к снижению поглощения питательных веществ и значительному уменьшению выживаемости личинок, выращенных в условиях ограниченного запаса пищи. С помощью модельной 3D-культуры клеток линии MDCK с нокаутом PLLP подтверждена роль PLLP в созревании лизосом, формировании ARE и поляризации клеток [62, 63].

Синтаксин 7 (Stx7) входит в семейство белков SNARE, экспонированных на поверхностях внутриклеточных транспортных везикул и участвующих в их слиянии с различными органелламимишенями и клеточной мембраной. Показано, что Stx7 может взаимодействовать с N-концевым доменом ENTH белка энтопротина (EpsR) и обеспечивать обратный транспорт мембранных белков на плазматическую мембрану [52-54, 58-62]. Установлено, что EpsR частично колокализуется с PLLP на внутренних эндосомах и может взаимодействовать с ним за счет своего С-концевого домена. Stx7 также колокализуется и взаимодействует с PLLP в субапикальном компартменте. Нокдаун PLLP в клетках MDCK приводит к снижению синтеза белков Rab7, EpsR, Stx7 и нарушению их локализации. Известно, что Rab7 регулирует переход сортировочных эндосом (SE) в поздние/литические эндосомы (LE). Влияние PLLP на Rab7 может указывать на его участие в созревании поздних эндосом. Существенно, что нокдаун stx7, EpsR или PLLP в клетках MDCK приводит к нарушению образования кисты в 3D-культуре клеток MDCK и неправильному распределению белка Rab11, что свидетельствует о вовлеченности PLLP в функционирование белков SNARE (рис. 4) [62, 63, 65].

Показано, что PLLP способен стимулировать интернализацию трансмембранных белков Crumbs (CRB) (рис. 5). Трансмембранные белки этого се-

мейства играют важную роль в установлении полярности эпителиальных клеток и регулируют морфогенез плотных и алгезивных контактов [64. 66, 67]. К числу таких белков относится Crumbs3 (CRB3). На модели 3D-культуры клеток MDCK показано, что динамика увеличения экспрессии PLLР в процессе образования кисты в 3D-культуре коррелирует с накоплением CRB3 в области плотных контактов и формированием незрелых апикальных соединительных комплексов (IAJC). которые в дальнейшем формируют зрелые адгезивные и плотные контакты (TJ). Нокдаун PLLP в клетках MDCK или их обработка ингибиторами эндоцитоза приводит к нарушению локализации CRB3 с его дальнейшим накоплением в области апикальных поверхностей клеток [62-64, 66]. В ходе анализа протеома клеток MDCK обнаружено, что PLLP может колокализоваться с N- и Cконцами окклюдина и N-концом клаудина-4. Совместную локализацию PLLP с окклюдином и клаудином-4 в области плотных контактов на базолатеральных плазматических мембранах клеток MDCK в дальнейшем подтвердили путем окрашивания антителами [45].

Установлено, что PLLP может играть существенную роль в активации сигнального пути Notch (рис. 5), необходимого для дифференцировки клеток. Нокаут PLLP у D. rerio приводит к нарушению Notch-сигнализации в клетках-предшественниках кишечного эпителия и к дефектам дифференцировки этих клеток. Схожие изменения возникают в клетках с мутацией *mib l^{ta52b}*, приводящей к нарушению передачи сигналов Notch, или при использовании химических ингибиторов Notch. Взаимодействие Notch с лигандом (например, Jagged-1 или Delta-like1) приводит к расщеплению Notch и высвобождению его внутриклеточного домена (NCID). Нокдаун pllp или EpsR в клетках MDCK приводит к снижению количества NICD, а сверхэкспрессия PLLP стимулирует интернализацию Notch. Совместное культивирование клеток MDCK, экспрессирующих Jagged-1, с клетками, дефектными по PLLP или EpsR, вызывает подавление активации Notch [62, 63].

РОЛЬ ПЛАЗМОЛИПИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Мутации в генах, кодирующих трансмембранные белки миелина, часто ассоциированы с наследственными демиелинизирущими заболеваниями. Так, мутации в гене, кодирующем PLP, приводят к болезни Пелицеуса–Мерцбахера, мутации в *PMP22* – к наследственной нейропатии, мутации в гене *GJB1*, кодирующем коннексин-32, к X-сцепленной болезни Шарко–Мари–Тута [69–75]. PLLP может быть вовлечен в развитие различных заболеваний.



Рис. 4. Возможное участие PLLP в везикулярном внутриклеточном транспорте посредством механизма сортировки белков SNARE. 1) Взаимодействие белка-карго с рецептором иницирует образование окаймленной ямки с привлечением окаймляющих белков, белков семейства Rab, а также v-SNARE (везикулярные SNARE). Привлечение специфических везикулярных SNARE может осуществляться путем их взаимодействия с PLLP через EpsinR. 2) Образование и отпочковывание окаймленной везикулы. 3) Удаление окаймляющих белков с поверхности везикулы. 4) Специфическое узнавание белка семейства Rab заякоривающим белком приводит к закреплению везикуль близи поверхности эндосомой. 5) Образование комплекса *транс*-SNARE. 6) Комплекс *транс*-SNARE опосредует слияние везикулы с эндосомой. 7) Распутывание комплекса *транс*-SNARE белком NSF позволяет рассортировать высвободившеся белки v-SNARE и t-SNARE (тартетные SNARE) для их повторного использования в везикулярном транспорте и эндоцитозе.

Онкологические заболевания

Изучение механизмов метастазирования меланомы и рака молочной железы на мышиных моделях выявило существенное увеличение экспрессии генов *CXCR4*, *PLLP* и *TNFSF4* в метастазах в головной мозг, а также генов *Tph2*, *Sspo* и *Polas* в окружающих их тканях [76, 77]. Известно, что опухолевые клетки глиобластомы претуморальной зоны головного мозга (PBZ) проявляют повышенную способность к инвазии по сравнению с клетками в ядре опухоли (TC). Установлено, что экспрессия *PLLP* в опухолевых клетках PBZ ниже, чем в клетках ядра опухоли [78].

Демиелинизирующие заболевания

Префронтальная кора составляет значительную часть ЦНС и играет важную роль в формировании социального поведения человека. Изучение профиля экспрессии генов в клетках префрон-



Рис. 5. В зрелых сортирующих эндосомах (SE/LE) PLLP может привлекать EpsR, который связывает эндосомный Stx7, и осуществлять рециркуляцию Stx7 через апикальные рециркулирующие эндосомы (ARE) в области апикальной мембрны. PLLP совместно с Stx7 может регулировать интернализацию CRB и рецептора Notch.

тальной коры головного мозга у людей разного возраста показало, что плазмолипин более значительно вовлечен в регуляцию экспрессии генов, отвечающих за функционирование клеток префронтальной коры v лиц 40-70 лет, чем в более ранние периоды жизни [79]. Предполагают, что PLLP вовлечен в развитие и поддержание нервной системы не только на стадии эмбриогенеза, но и на протяжении всей жизни. Установлено, что хроническая депривация сна может приводить к истончению миелина, нарушению развития предшественников олигодендроцитов и сопровождаться снижением экспрессии генов, участвующих в миелинизации, включая гены PLLP и CD-9. Экспрессия PLLP и других генов, участвующих в формировании миелина (OPALIN, Qk), сильно возрастает уже через несколько часов после засыпания [80-82]. По-видимому, нарушение дифференцировки олигодендроцитов и, как следствие, нарушение миелинизации может приводить к шизофрении и большому депрессивному расстройству. Анализ транскриптома клеток височной коры пациентов с этими заболеваниями выявил значительное снижение экспрессии PLLP и генов, связанных с дифференцировкой олигодендроцитов и структурными компонентами миелина [83-90]. Это представляет существенный интерес, поскольку в участке гена, кодирующего домен ENTH EpsR, обнаружены полиморфизмы, ассоциированные с развитием шизофрении [63, 86, 91]. С помощью протеомного анализа образцов неокортекса, полученных от пациентов с болезнью Альцгеймера, выявлено повышение количества PLLP, что может указывать на его связь с развитим данного заболевания [92].

Эндокринные заболевания

PLLP может быть вовлечен в развитие осложнений, возникающих при сахарном диабете типа 2 (инсулиннезависимый сахарный диабет). К числу таких осложнений относятся диабетическая стопа, микро- и макроангиопатия, почечная недостаточность и ретинопатия, приводящая к слепоте. Показано, что уровень экспрессии *PLLP* и синтаксина 7 в образцах кожи пациентов с диабетом типа 2 значительно ниже, чем у здоровых людей. Вклад PLLP связывают с его участием в регуляции сигнального пути Notch, вовлеченного в регенерацию эпидермиса и заживление ран [63, 93, 94].

Дегенеративные заболевания глаз

Кератоконус — прогрессирующее дегенеративное заболевание роговицы глаза, приводящее к ухудшению зрительной функции. Этиология этого заболевания до сих пор не известна. В ходе анализа транскриптома образцов, полученных от пациентов с кератоконусом, установлено значительное снижение уровней экспрессии как *PLLP*, так и *Notch1* на начальных стадиях этого заболевания по сравнению с уровнями в образцах, полученных от здоровых доноров. Это косвенно указывает на участие PLLP в поддержании нормальной структуры роговицы человека [95].

Системные заболевания

Саркоидоз – мультисистемное, воспалительное заболевание, отличительной чертой которого является образование гранулем в пораженных органах. В 95% случаев саркоидоза развиваются поражения легких. В результате протеомного анализа обнаружено снижение количества PLLP в смывах, полученных при бронхоальвеолярном лаваже больных саркоидозом. Кроме того, выявлены существенные изменения протеома, позволяющие судить об активном участии различных цитокинов в развитии саркоидоза [96]. Необходимо отметить обратную зависимость между экспрессией PLLP и генов, кодирующих некоторые цитокины и факторы роста (IL-1, IL-6, IL-8, VEGFA), что может косвенно указывать на возможное участие PLLP в механизмах регуляции экспрессии этих генов [83, 84, 97-101].

Генетические заболевания

Гиперальфалипопротеинемия – редкое заболевание, вызванное нарушением обмена липопротеинов, при котором повышается содержание липопротеинов высокой потности (HDL) в плазме крови. HDL участвуют в обратном транспорте холестерина, обладают антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, тем самым способствуя кардиопротекции. При помощи полноэкзомного секвенирования образцов, полученных от пациентов с гиперальфалипопротеинемией, выявлено несколько несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов (nsSNP) в генах, связанных с обменом липидов. Необходимо отметить, что в гене *PLLP* обнаружены три nsSNP, что может указывать на возможность участия PLLР в обмене липидов и развитии гиперальфалипопротеинемии [102]. Известно, что новосинтезированный белок ароА-I, секретируемый гепатоцитами и энтероцитами, участвует в биогенезе еще незрелых частиц HDL, взаимодействуя с АТР-связывающим кассетным транспортером типа А1 (ABCA1). Это взаимодействие опосредует отток клеточного холестерина и фосфолипидов от клеточной мембраны к ароА-І с последующим образованием дискоидных предшественников HDL (pre-β-HDL). Уменьшение количества холестерина и фосфолипидов на плазматической мембране приводит к подавлению оттока холестерина, опосредованного ABCA1, в то время как избыток холестерина и фосфолипидов приводит к его увеличению. Таким образом, представленность холестерина на плазматических мембранах гепатоцитов и энтероцитов может влиять на образование HDL [6, 103, 104]. Интересно, что в результате замены A53V в молекуле PLLP появляется дополнительный ØxxØ-мотив, который может облегчить олигомеризацию PLLP, необходимую для образования и поддержания богатых холестерином липидных рафтов.

На длинном плече хромосомы 16 (16q13), где картирован ген *PLLP* человека, локализован также локус гена *BBS2* (16q13–21), мутации в котором вызывают синдром Барде–Бидля типа 2 – редкое аутосомно-доминантное наследственное заболевание, имеющее полиморфные клинические проявления, включая колбочко-палочковую дистрофию, ожирение, дисфункцию почек и умственную отсталость. Предполагают, что PLLP может быть связан с развитием синдрома Барде– Бидля типа 2 [21, 105].

Роль плазмолипина и его гомологов в вирусной инфекции

Эндогенный ретровирус мышей *Mus caroli* (McERV) считается родственным вирусу лейкоза гиббонов (GALV), а также эндогенным ретровирусам *M. dunni* (MDEV) и *M. musculus* (MmERV) [106]. В результате анализа, проведенного с помощью бактериальных искусственных хромосом, установленно, что PLLP может использоваться в качестве рецептора для проникновения McERV в клетку. Как уже отмечено ранее, PLLP человека и мыши имеют высокую степень гомологии. McERV способен эффективно заражать клетки как мыши, так и человека, что имеет существенное значение в связи с высокой вероятностью межвидового переноса [106, 107].

Вирусы желтой головы (YHV) и синдрома белого пятна (WSSV) относятся к основным патогенным вирусам белых креветок (*Litopenaeus vannamei*) и черных тигровых креветок (*Penaeus monodon*), они вызывают массовую гибель ракообразных в условиях аквакультуры. Лимфоидные органы, жабры и мягкие ткани головы относятся к основным мишеням YHV. Известно, что развитие инфекций, вызванных YHV и WSSV, способствует повышению экспрессии двух изоформ PLLP – PmPLP1 и PmPLP2, которые синтезируются в здоровых тканях лимфоидных органов, нервных тканях, жабрах, гемоцитах и кишечнике креветок и служат рецепторами для проникновения вирусов в клетку [108, 109].

Все эти данные указывают на возможное участие PLLP и его гомологов в патогенезе вирусных инфекций. Известно, что часть вирусных белков (например, ZIKV, SARS-CoV-2) содержит общий УххØ-мотив, который обеспечивает их связывание с клеточными адаптерными белками, вовлеченными во внутриклеточный транспорт. PLLP участвует во внутриклеточном транспорте белков, часто обнаруживается на плазматической мембране и способен привлекать белок EpsR, который, в свою очередь, также может взаимодействовать с адаптерными белками. Приведенные сведения могут указывать на участие PLLP в регуляции внутриклеточных механизмов, ответственных за важные этапы жизненного цикла вирусов, например, за проникновение вирусов в клетку [110, 111].

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 17-29-06049 и № 20-04-60401).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Folch J., Lees M. (1951) Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain. J. Biol. Chem. 191(2), 807–817.
- Eng L.F., Chao F.-C., Gerstl B., Pratt D., Tavaststjerna M.G. (1968) The maturation of human white matter myelin. Fractionation of the myelin membrane proteins. *Biochem.* 7(12), 4455–4465.
- Siegel G., Albers R.W., Brady S., Price D. (2006) Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 7th ed. Elsevier Acad. Press Inc.
- Agrawal H.C., Hartman B.K., Shearer W.T., Kalmbach S., Margolis F.L. (1977) Purification and immunohistochemical localization of rat brain myelin proteolipid protein. *J. Neurochem.* 28, 495–508.
- Lees M., Sakura D., Sapirstein V., Curatolo W. (1979) Structure and function of proteolipids in myelin and non-myelin membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 559, 209–230.
- Folch-Pi J., Stoffyn P.J. (1972) Proteolipids from membrane systems. Ann. N.Y. Acad. Sci. 195, 86–107.
- Guerin M., Napias C. (1978) Phosphate transport in yeast mitochondria: purification and characterization of a mitoribosomal synthesis dependent proteolipid showing a high affinity for phosphate. *Biochem.* 17(13), 2510–2516.
- Racker E., Eytan E. (1975) A coupling factor from sarcoplasmic reticulum required for the translocation of Ca²⁺ ions in a reconstituted Ca²⁺ATPase pump. *J. Biol. Chem.* 250(18), 7533–7534.
- 9. Farrell L.B., Nagley P. (1987) Human liver cDNA clones encoding proteolipid subunit 9 of the mitochondrial ATPase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**(3), 1257–1264.
- Sapirstein V., Rounds T.C. (1983) Circular dichroism and fluorescence studies on a cation channel forming plasma membrane proteolipid. *Biochemistry*. 22(14), 3330–3335.

- 11. Fischer I., Durrie R., Sapirstein V. (1994) Plasmolipin: the other myelin proteolipid. A review of studies on its structure, expression, and function. *Neurochem. Res.* **19**(8), 959–966.
- 12. Tosteson M.T., Sapirstein V. (1981) Protein interactions with lipid bilayers: the channels of kidney plasma membrane proteolipids. *J. Membrane Biol.* **63**, 77–84.
- Gillen C., Gleichmann M., Greiner-Petter R., Zoidl G., Kupfer S., Bosse F., Auer J., Muller H.W. (1996) Fulllength cloning, expression and cellular localization of rat plasmolipin mRNA, a proteolipid of PNS and CNS. *Europ. J. Neurosci.* 8, 405–414.
- 14. Wilson G.F., Chiu S.Y. (1993) Mitogenic factors regulate ion channels in Schwann cells cultured from newborn rat sciatic nerve. *J. Physiol.* **470**, 501–520.
- 15. Fischer I., Sapirstein V. (1986) Characterization and biosynthesis of the plasma membrane proteolipid protein in neural tissue. *J. Neurochem.* **47**, 232–238.
- Fischer I., Sapirstein V. (1994) Molecular cloning of plasmolipin. Characterization of a novel proteolipid restricted to brain and kidney. *J. Biol. Chem.* 269(40), 24912–24919.
- 17. Kalwy S.A., Smith R., Kidd G.J. (1997) Myelin proteolipid protein expressed in COS-1 cells is targeted to actin-associated surfaces. *J. Neurosci. Res.* **48**, 201–211.
- Cochary E.F., Bizzozero O.A., Sapirstein V., Nolan C., Fischer I. (1990) Presence of the plasma membrane proteolipid (plasmolipin) in myelin. *J. Neurochem.* 55, 602–610.
- Rost B., Sander C. (1994) Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins*. 19, 55–72.
- Yaffe Y., Shepshelovitch J., Nevo-Yassaf I., Yeheskel A., Shmerling H., Kwiatek J.M., Gaus K., Pasmanik-Chor M., Hirschberg K. (2012) The MARVEL transmembrane motif of occluding mediates oligomerization and targeting to the basolateral surface in epithelia. J. Cell. Sci. 125(15), 3545–3556.
- Hamacher M., Pippirs U., Kohler A., Muller H.W., Bosse F. (2001) Plasmolipin: genomic structure, chromosomal localization, protein expression pattern, and putative association with Bardet-Biedl syndrome. *Mammalian Genome*. 12, 933–937.
- 22. Strausberg R.L., Feingold E.A., Grouse L.H., Derge J.G., Klausner R.D., Collins F.S., Wagner L., Shenmen C.M., Schuler G.D., Altschul S.F., Zeeberg B., Buetow K.H., Schaefer C.F., Bhat N.K., Hopkins R.F., Jordan H., Moore T., Max S.I., Wang J., Hsieh F., Diatchenko L., Marusina K., Farmer A.A., Rubin G.M., Hong L., Stapleton M., Soares M.B., Bonaldo M.F., Casavant T.L., Scheetz T.E., Brownstein M.J., Usdin T.B., Toshiyuki S., Carninci P., Prange C., Raha S.S., Loquellano N.A., Peters G.J., Abramson R.D., Mullahy S.J., Bosak S.A., McEwan P.J., McKernan K.J., Malek J.A., Gunaratne P.H., Richards S., Worley K.C., Hale S., Garcia A.M., Gay L.J., Hulyk S.W., Villalon D.K., Muzny D.M., Sodergren E.J., Lu X., Gibbs R.A., Fahey J., Helton E., Ketteman M., Madan A., Rodrigues S., Sanchez A., Whiting M., Madan A., Young A.C., Shevchenko Y., Bouffard G.G., Blakesley R.W., Touchman J.W., Green E.D., Dickson M.C., Rodriguez A.C., Grimwood J., Schmutz J., Myers R.M., Butterfield Y.S.N.,

Krzywinski M.I., Skalska U., Smailus D.E., Schnerch A., Schein J.E., Jones S.J.M., Marra M.A. (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**(26), 16899–16903.

- 23. Martin J., Han C., Gordon L.A., Terry A., Prabhakar S., She X., Xie G., Hellsten U., Man Chan Y., Altherr M., Couronne O., Aerts A., Bajorek E., Black S., Blumer H., Branscomb E., Brown N.C., Bruno W.J., Buckingham J.M., Callen D.F., Campbell C.S., Campbell M.L., Campbell E.W., Caoile C., Challacombe J.F., Chasteen L.A., Chertkov O., Chi H.C., Christensen M., Clark L.M., Cohn J.D., Denvs M., Detter J.C., Dickson M., Dimitrijevic-Bussod M., Escobar J., Fawcett J.J., Flowers D., Fotopulos D., Glavina T., Gomez T., Gonzales E., Goodstein D., Goodwin L.A., Grady D.L., Grigoriev I., Groza M., Hammon N., Hawkins T., Haydu L., Hildebrand C., Huang W., Israni S., Jett J., Jewett P.B., Kadner K., Kimball H., Kobayashi A., Krawczyk M.-K., Leyba T., Longmire J.L., Lopez F., Lou Y., Lowry S., Ludeman T., Manohar C.F., Mark G.A., McMurray K.L., Meincke L.J., Morgan J., Moyzis R.K., Mundt M.O., Munk C., Nandkeshwar R.D., Pitluck C., Pollard M., Predki P., Parson-Quintana B., Ramirez C., Rash S., Retterer J., Ricke D.O., Robinson D.L., Rodriguez A., Salamov A., Saunders E.H., Scott D., Shough T., Stallings R.L., Stalvey M., Sutherland R.D., Tapia R., Tesmer J.G., Thayer N., Thompson L.S., Tice H., Torney D.C., Tran-Gyamfi M., Tsai M., Ulanovsky L.E., Ustaszewska A., Vo N., White P.S., Williams A.L., Wills P.L., Wu J.-R., Wu K., Yang J., Dejong P., Bruce D., Doggett N.A., Deaven L., Schmutz J., Grimwood J., Richardson P., Rokhsar D.S., Eichler E.E., Gilna P., Lucas S.M., Myers R.M., Rubin E.M., Pennacchio L.A. (2004) The sequence and analysis of duplication-rich human chromosome 16. Nature. **432**(7020), 988–994.
- Fischer I., Cochary E.F., Konola J.T., Romano-Clarke G. (1991) Expression of plasmolipin in oligodendrocytes. J. Neurosci. Res. 28, P. 81–89.
- 25. Alonso M.A., Weissman S.M. (1987) cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 1997–2001.
- Magyar J., Ebensperger C., Schaeren-Wiemers N., Suter U. (1997) Myelin and lymphocyte protein (MAL/MVP17/VIP17) and plasmolipin are members of an extended gene family. *Gene.* 189, P. 269–275.
- Kim T., Fiedler K., Madison D.L., Krueger W.H., Pfeiffer S.E. (1995) Cloning and characterization of MVPI7: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* 42, 413–422.
- 28. Puertollano R., Alonso M.A. (1999) MAL, an integral element of the apical sorting machinery, is an itinerant protein that cycles between the trans-Golgi network and the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 3435–3447.
- Puertollano R., Martin-Belmonte F., Millan J., de Marco M.C., Albar J.P., Kremer L., Alonso M.A. (1999) The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* **145**(1), 141–151.

- Martin-Belmonte F., Arvan P., Alonso M.A. (2001) MAL mediates apical transport of secretory proteins in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 276(52), 49337–49342.
- Perez P., Puertollano R., Alonso M.A. (1997) Structural and biochemical similarities reveal a family of proteins related to the MAL proteolipid, a component of detergent-insoluble membrane microdomains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 618–621.
- Sanchez-Pulido L., Martin-Belmonte F., Valencia A., Alonso M.A. (2002) MARVEL: a conserved domain involved in membrane apposition events. *Trends Biochem. Sci.* 27(12), 599–601.
- Janz R., Sudhof T.C., Hammer R.E., Unni V., Siegelbaum S.A., Bolshakov V.Y. (1999) Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I. *Neuron.* 24(3), 687–700.
- 34. Haass N.K., Kartenbeck M.A., Leube R.E. (1996) Pantophysin is a ubiquitously expressed synaptophysin homologue and defines constitutive transport vesicles. *J. Cell Biol.* 134(3), 731–746.
- Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123**(6), 1777–1788.
- Raleigh D.R., Marchiando A.M., Zhang Y., Shen L., Sasaki H., Wang Y., Long M., Turner J.R. (2010) Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol. Biol. Cell.* 21, 1200–1213.
- Chou A., Lee A., Hendargo K.J., Reddy V.S., Shlykov M.A., Kuppusamykrishnan H., Medrano-Soto A., Saier Jr M.A. (2017) Characterization of the tetraspan junctional complex (4JC) superfamily. *Biochim. Biophys. Acta.* 1859(3), 402–414.
- Bosse F., Hasse B., Pippirs U., Greiner-Petter R., Muller H.W. (2003) Proteolipid plasmolipin: localization in polarized cells, regulated expression and lipid raft association in CNS and PNS myelin. *J. Neurochem.* 86, 508–518.
- 39. Cochary E., Konola J., Fischer I. (1990) Expression and localization of plasmolipin in oligodendroglia. *Trans. Am. Soc. Neurochem.* **21**, 397.
- Sapirstein V., Durrie R., Nolan C., Marks N. (1993) Identification of membrane-bound carbonic anhydrase in white matter coated vesicles: the fate of carbonic anhydrase and other white matter coated vesicle proteins in triethyl tin-induced leukoencephalopathy. *J. Neurosci. Res.* 35, 83–91.
- 41. Sapirstein V., Durrie R., Cherksey B., Beard M.E., Flynn C.J., Fischer I. (1992) Isolation and characterization of periaxolemmal and axolemmal enriched membrane fractions from the rat central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **32**, 593–604.
- 42. Yaffe Y., Hugger I., Yassaf I.N., Shepshelovitch J., Sklan E.H., Elkabetz Y., Yeheskel A., Pasmanik-Chor M., Benzing C., Macmillan A., Gaus K., Eshed-Eisenbach Y., Peles E., Hirschberg K. (2015) The myelin proteolipid plasmolipin forms oligomers and induces

liquid-ordered membranes in the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **128**, 2293–2302.

- 43. Shea T., Fischer I., Sapirstein V. (1986) Expression of a plasma membrane proteolipid during differentiation of neuronal and glial cells in primary culture. *J. Neurochem.* **47**, 697–706.
- Hasse B., Bosse F., Muller H.W. (2002) Proteins of peripheral myelin are associated with glycosphingolipid/cholesterol-enriched membranes. *J. Neurosci. Res.* 69, 227–232.
- 45. Fredriksson K., Van Itallie C.M., Aponte A., Gucek M., Tietgens A.J., Anderson J.M. (2015) Proteomic analysis of proteins surrounding occludin and claudin-4 reveals their proximity to signaling and trafficking networks. *PloS One.* **10**(3), e0117074.
- Sapirstein V., Nolan C., Stern R., Ciocci M., Masur S. (1988) Identification of the plasma membrane proteolipid protein as a constituent of brain coated vesicles and synaptic plasma membrane. *J. Neurochem.* 51, 925–933.
- Sapirstein V., Nolan C., Stern R., Gray-Board G., Beard M. (1992) Identification of plasmolipin as a major constituent of white matter clathrin-coated vesicles. *J. Neurochem.* 58, 1372–1378.
- Haucke V. (2005) Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* 33(6), 1285–1289.
- Sapirstein V., Nolan C., Stadler I.I., Fischer I. (1992) Expression of plasmolipin in the developing rat brain. *J. Neurosci. Res.* 31, 96–102.
- 50. Shea T.B., Fischer I. (1989) Expression of the plasma membrane proteolipid in mouse neuroblastoma cells: transient increase in synthesis during differentiation with N⁶,O²-dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Expl. Cell. Biol.* 57, 131–138.
- Magal L.G., Yaffe Y., Shepshelovich J., Aranda J.F., de Marco M.C., Gaus K., Alonso M.A., Hirschberg K. (2009) Clustering and lateral concentration of raft lipids by the MAL protein. *Mol. Biol. Cell.* 20(16), 3751– 3762.
- Seabra M.C., Mules E.H., Hume A.N. (2002) Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol. Med.* 2002. 8(1), 23–30.
- 53. Bonifacino J.S., Glick B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* **116**(2), 153–166.
- 54. Mills I.G., Praefcke G.J.K., Vallis Y., Peter B.J., Olesen L.E., Gallop J.L., Butler P.J.G., Evans P.R., McMahon H.T. (2003) EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *J. Cell. Biol.* 160(2), 213–222.
- 55. Perret E., Lakkaraju A., Deborde S., Schreiner R., Rodriguez-Bouln E. (2005) Evolving endosomes: how many varieties and why? *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**(4), 423–434.
- Winckler B., Faundez V., Maday S., Cai Q., Almeida C.G., Zhang H. (2018) The endolysosomal system and proteostasis: from development to degeneration. *J. Neurosci.* 38(44), 9364–9374.
- Hu C., Ahmed M., Melia T.J., Sollner T., Mayer T., Rothman J. (2003) Fusion of cells by flipped SNAREs. *Science*. 300(5626), 1745–1749.

- Miller S.E., Collins B.M., McCoyA.J., Robinson M.S., Owen D.J. (2007) A SNARE-adaptor interaction is a new mode of cargo recognition in clathrin-coated vesicles. *Nature*. 450(7169), 570–574.
- 59. Chidambaram S., Müllers N., Wiederhold K., Haucke V., Fischer von Mollard G. (2004) Specific interaction between SNAREs and epsin N-terminal homology (ENTH) domains of epsin-related proteins in trans-Golgi network to endosome transport. *J. Biol. Chem.* 279(6), 4175–4179.
- Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. (2013) Клатрин-зависимый эндоцитоз и белки-адаптеры. Acta Naturae. 5(3), 66–77.
- Prekeris R., Yang B., Oorschot V., Klumperman J., Scheller R.H. (1999) Differential roles of syntaxin 7 and syntaxin 8 in endosomal trafficking. *Mol. Biol. Cell.* 10(11), 3891–3908.
- Guelte A.L., Macara I.G. (2015) Plasmolipin a new player in endocytosis and epithelial development. *EM-BO J.* 34(9), 1147–1148.
- Rodriguez-Fraticelli A.E., Bagwell J., Bosch-Fortea M., Boncompain G., Reglero-Real N., Garcia-Leon M.J., Andres G., Toribio M.L., Alonso M.A., Millan J., Perez F., Bagnat M., Martin-Belmonte F. (2015). Developmental regulation of apical endocytosis controls epithelial patterning in vertebrate tubular organs. *Nat. Cell. Biol.* 17, 241–250.
- 64. Rodriguez-Boulan E., Macara I.G. (2014) Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 225–242.
- 65. Roux K.J., Kim D.I., Raida M., Burke B. (2012) A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* **196**(6), 801–810.
- 66. Thompson B.J., Pichaud F., Roper K. (2013) Sticking together the Crumbs an unexpected function for an old friend. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **14**, 307–314.
- Jewett C.E., Prekeris R. (2018) Insane in the apical membrane: trafficking events mediating apicobasal epithelial polarity during tube morphogenesis. *Traffic.* 19, 666–678.
- Vaccari T., Lu H., Kanwar R., Fortini M.E., Bilder D. (2008) Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*. J. Cell. Biol. 180(4), 755–762.
- 69. Spreyer P., Kuhn G., Hanemann C., Gillen C., Schaal H., Kuhn R., Lemke G., Müller H.W. (1991) Axon-regulated expression of a Schwann cell transcript that is homologous to a 'growth arrest-specific' gene. *EMBO J.* **10**(12), 3661–3668.
- Schaeren-Wiemers N., Valenzuela D.M., Frank M., Schwab M.E. (1995) Characterization of a rat gene, rMAL, encoding a protein with four hydrophobic domains in central and peripheral myelin. *J. Neurosci.* 15(8), 5753–5764.
- Bennett M.V.L., Bario L.C., Bargiello T.A., Spray D.C., Hertzberg E., Sáez J.C. (1991) Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron.* 6, 305– 320.
- 72. Hobson G.M., Garbern J.Y. (2012) Pelizaeus–Merzbacher disease, Pelizaeus–Merzbacher-like disease 1,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

and related hypomyelinating disorders. *Semin. Neurol.* **32**, 62–67.

- Lupski J.R., Wise C.A., Kuwano A., Pentao L., Parke T.J., Glaze D.G., Ledbetter D.H., Greenberg F., Patel P.I. (1992) Gene dosage is a mechanism for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat. Genet.* 1(1), 29–33.
- 74. Bergoffen J., Scherer S.S., Wang S., Scott M.O., Bone L.J., Paul D.L., Chen K., Lensch M.W., Chance P.F., Fischbeck K.H. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*. 262(5142), 2039–2042.
- Chance P.F., Alderson M.K., Leppig K.A., Lensch M.W., Matsunami N., Smith B., Swanson P.D., Odelberg S.J., Disteche C.M., Bird T.D. (1993) DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell.* 72, 143–151.
- 76. Sato R., Nakano T., Hosonaga M., Sampetrean O., Harigai R., Sasaki T., Koya I., Okano H., Kudoh J., Saya H., Arima Y. (2017) RNA sequencing analysis reveals interactions between breast cancer or melanoma cells and the tissue microenvironment during brain metastasis. *Biomed. Res. Int.* 1–10.
- 77. Bos P.D., Zhang X. H.-F, Nadal C., Shu W., Gomis R.R., Nguyen D.X., Minn A.J., van de Vijver M.J., Gerald W.L., Foekens J.A., Massagué J. (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. 459(7249), 1005–1009.
- Luo X., Xu S., Zhong Y., Tu T., Xu Y., Li X., Wang B., Yang F. (2019) High gene expression levels of VEGFA and CXCL8 in the peritumoral brain zone are associated with the recurrence of glioblastoma: a bioinformatics analysis. *Oncol. Lett.* 18(6), 6171–6179.
- Wang H., Wu Y., Fang R., Sa J., Li Z., Cao H., Cui Y. (2020) Time-varying gene network analysis of human prefrontal cortex development. *Front. Genet.* 11, 1–17.
- Bellesi M., Haswell J.D., Vivo L., Marshall W., Roseboom P., Tononi G., Cirelli C. (2018) Myelin modifications after chronic sleep loss in adolescent mice. *Sleep.* 41(5), 1–11.
- Bellesi M., Pfister-Genskow M., Maret S., Keles S., Tononi G., Cirelli C. (2013) Effects of sleep and wake on oligodendrocytes and their precursors. *J. Neurosci.* 33(36), 14288–14300.
- Nakamura Y., Iwamoto R., Mekada E. (1996) Expression and distribution of CD9 in myelin of the central and peripheral nervous systems. *Am. J. Pathol.* 149(2), 575–583.
- Aston C., Jiang L., Sokolov B. (2004) Microarray analysis of postmortem temporal cortex from patients with schizophrenia. J. Neurosci. Res. 77(6), 858–866.
- Aston C., Jiang L., Sokolov B. (2005) Transcriptional profiling reveals evidence for signaling and oligodendroglial abnormalities in the temporal cortex from patients with major depressive disorder. *Mol. Psych.* 10, 309–322.
- 85. Коломеец Н.С. (2017) Нарушения дифференцировки олигодендроцитов в мозге при шизофрении: связь с основными гипотезами заболевания. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 117(8), 108–117.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

- 86. Tang R.Q., Zhao X.Z., Shi Y.Y., Tang W., Gu N.F., Feng G.Y., Xing Y.L., Zhu S.M., Sang H., Liang P.J., He L. (2006) Family-based association study of epsin 4 and schizophrenia. *Mol. Psych.* 11(4), 395–399.
- 87. Harrison P.J. (1999) The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*. **122**, 593–624.
- Tkachev D., Mimmack M.L., Ryan M.M., Wayland M., Freeman T., Jones P.B., Starkey M., Webster M.J., Yolken R.H., Bahn S. (2003) Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet.* 362, 798–805.
- Mirnics K., Middleton F.A., Marquez A., Lewis D.A., Levitt P. (2000) Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron.* 28, 53–67.
- Meucci O., Fatatis A., Simen A.A., Miller R.J. (2000) Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 8075–8080.
- 91. Pimm J., McQuillin A., Thirumalai S., Lawrence J., Quested D., Bass N., Lamb G., Moorey H., Datta S.R., Kalsi G., Badacsonyi A., Kelly K., Morgan J., Punukollu B., Curtis D., Gurling H. (2005) The epsin 4 gene on chromosome 5q, which encodes the clathrinassociated protein enthoprotin, is involved in the genetic susceptibility to schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* **76**(5), 902–907.
- Musunuri S., Wetterhall M., Ingelsson M., Lannfelt L., Artemenko K., Bergquist J., Kultima K., Shevchenko G. (2014) Quantification of the brain proteome in Alzheimer's disease using multiplexed mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 13, 2056–2068.
- 93. Takematsu E., Spencer A., Auster J., Chen P.-C., Graham A., Martin P., Baker A.B. (2020) Genome wide analysis of gene expression changes in skin from patients with type 2 diabetes. *PloS One.* 15(2), e0225267.
- 94. Shu B., Yang R., Shi Y., Xu Y.-B., Wang P., Lio X.S., Qi S.-H., Xie J.-L. (2016) Notch1 signaling regulates wound healing via changing the characteristics of epidermal stem cells. J. Stem Cell Res. Ther. 6(7), 1–10.
- 95. You J., Corley S., Wen L., Hodge C., Höllhumer R., Madigan M.C., Wilkins M.R., Sutton G. (2018) RNA-Seq analysis and comparison of corneal epithelium in keratoconus and myopia patients. *Sci. Rep.* 8(1), 1–13.
- 96. Bhargava M., Viken K.J., Barkes B., Griffin T.J., Gillespie M., Jagtap P.D., Sajulga R., Peterson E.J., Dincer H.E., Li L., Restrepo C.I., O'Connor B.P., Fingerlin T.E., Perlman D.M., Maier L.A. (2020) Novel protein pathways in development and progression of pulmonary sarcoidosis. *Sci. Rep.* 10, 13282.
- 97. Swindell W.R., Beamer M.A., Sarkar M.K., Loftus S., Fullmer J., Xing X., Ward N.L., Tsoi L.C., Kahlenberg M.J., Liang Y., Gudjonsson J.E. (2018) RNA-Seq analysis of IL-1B and IL-36 responses in epidermal keratinocytes identifies a shared MyD88-dependent gene signature. *Front. Immunol.* 9(80), 1–20.
- Luo X., Xu S., Zhong Y., Tu T., Xu Y., Li X., Wang B., Yang F. (2019) High gene expression levels of VEGFA and CXCL8 in the peritumoral brain zone are associ-

ated with the recurrence of glioblastoma: a bioinformatics analysis. *Oncol. Lett.* **18**, 6171–6179.

- Shelton R.C., Claiborne J., Sidoryk-Wegrzynowicz M., Reddy R., Aschner M., Lewis D.A., Mirnics K. (2011) Altered expression of genes involved in inflammation and apoptosis in frontal cortex in major depression. *Mol. Psychiatry*. 16(7), 751–762.
- 100. Zhou B., Zhu Z., Ransom B.R., Xiaoping T. (2021) Oligodendrocyte lineage cells and depression. *Mol. Psychiatry*. 26, 103–117
- 101. Xu L., Qi X., Zhu C., Wan L. (2018) Activation of IL-8 and its participation in cancer in schizophrenia patients: new evidence for the autoimmune hypothesis of schizophrenia. *Neur. Dis. Treat.* 14, 3393–3403.
- 102. Oates C.P., Koenig D., Rhyne J., Bogush N., O'Connel J., Mitchell B.D., Miller M. (2018) Novel polymorphisms associated with hyperalphalipoproteinemia and apparent cardioprotection. *J. Clin. Lipidol.* **12**(1), 110–115.
- 103. Sun Y., Hao M., Luo Y., Liang C.-P., Silver D.L., Cheng C., Maxfield F.R., Tall A.R. (2003) Stearoyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. *J. Biol. Chem.* 278(8), 5813–5820.
- Rothblat G.H., Phillips M.C. (2010) High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr. Opin. Lipidol.* 21(3), 229–238.
- 105. Kwitek-Black A.E., Carmi R., Duyk G.M., Buetow K.H., Elbedour K., Parvari R., Yandava C.N., Stone E.M., Sheffield V.C. (1993) Linkage of Bardet–Biedl syn-

drome to chromosome 16q and evidence for non-allelic genetic heterogeneity. *Nat. Genet.* **5**, 392–396.

- 106. Denner J. (2016) Transspecies transmission of gammaretroviruses and the origin of the gibbon ape leukaemia virus (GaLV) and the koala retrovirus (KoRV). *Viruses.* **8**(336), 1–10.
- 107. Miller A.D., Bergholz U., Ziegler M., Stocking C. (2008) Identification of the myelin protein plasmolipin as the cell entry receptor for *Mus caroli* endogenous retrovirus. *J. Virol.* 82(14), 6862–6868.
- Vatanavicharn T., Pongsomboon S., Tassanakajon A. (2012) Two plasmolipins from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* and their response to virus pathogens. *Dev. Comp. Immunol.* 8, 389–394.
- 109. Matjank W., Ponprateep S., Rimphanitchayakit V., Rimphanitchayakit V., Tassanakajon A., Somboonwiwat K., Vatanavicharn T. (2018) Plasmolipin, Pm-PLP1, from *Penaeus monodon* is a potential receptor for yellow head virus infection. *Dev. Compar. Immun.* 88, 137–143.
- 110. Yuan S., Chu H., Huang J., Zhao X., Ye Z.-W., Lai P.-M., Wen L., Cai J.-P., Mo Y., Cao J., Liang R., Poon V. K.-M., Sze K.-H., Zhou J., To K. K.-W., Chen Z., Chen H., Jin D.-Y., Chan J. F.-W., Yuen K.-Y. (2020) Viruses harness YxxØ motif to interact with host AP2M1 for replication: a vulnerable broad-spectrum antiviral target. *Sci. Adv.* 6, eaba7910.
- Hist J., Motley A., Harasaki K., Chew S.Y.P., Robinson M.S. (2003) EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. *Mol. Biol. Cell.* 14(2), 625–641.

PLASMOLIPIN AND ITS ROLE IN CELLULAR PROCESSES

A. A. Shulgin^{1, 2, *}, T. D. Lebedev¹, V. S. Prassolov¹, and P. V. Spirin¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

*e-mail: ashu69@mail.ru

Determination of mechanisms involved in the occurrence and development of malignant and neurodegenerative diseases is an important area of modern biomedicine. The identification of new molecular markers associated with intracellular signaling rearrangements which can be used for diagnostics and the development of effective treatment approaches is a crucial task. One of such possible markers may be proteolipid plasmolipin (PLLP). This proteolipid is one of the main components of the myelin sheath and plays an important role in the development of nervous system and its normal functioning. PLLP is involved in intracellular transport, lipid raft formation, and Notch signaling. It is considered that PLLP may be involved in development of various disorders and pathologies such as cancer, schizophrenia, Alzheimer's disease, type 2 diabetes. PLLP and its homologues were identified as possible virus entry receptors. This review summarizes data on the plasmolipin structure, its normal functions, and role in diseases.

Keywords: proteolipids, neurodegenerative diseases, Notch signaling, SNARE, MARVEL, intracellular transport, lipid rafts, ion channels

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 577.12615.281

Памяти Сергея Николаевича Михайлова посвящается

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ И ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕОЗИДОВ: СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ¹

© 2021 г. А. А. Зенченко^{*a*}, М. С. Дреничев^{*a*}, *, И. А. Ильичева^{*a*}, С. Н. Михайлов^{*a*}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия *e-mail: mdrenichev@mail.ru

Поступила в редакцию 20.01.2021 г. После доработки 03.04.2021 г. Принята к публикации 09.04.2021 г.

Появление новых вирусов и резистентных штаммов патогенных микроорганизмов стало мошным стимулом для поиска новых лекарственных средств. Нуклеозиды – один из перспективных классов природных соединений, на основе которых уже создано более ста лекарственных препаратов, включая противовирусные, антибактериальные и противоопухолевые средства. В обзоре рассмотрены структурно-функциональные особенности и механизмы действия известных аналогов нуклеозидов, обладающих противовирусной, антибактериальной или антипротозойной активностью. Особое внимание уделено механизмам, которые определяют противовирусный эффект аналогов нуклеозидов, содержащих гидрофобные фрагменты. В зависимости от структуры и положения гидрофобного заместителя такие нуклеозиды могут либо блокировать процесс проникновения вирусов в клетки, либо ингибировать стадию репликации их геномов. Проведено сравнение механизмов ингибирования вирусных ферментов соединениями нуклеозидной и ненуклеозидной природы. Рассмотрены стадии создания антипаразитарных препаратов, которые базируются на данных об особенностях метаболических превращений нуклеозидов в организме человека и организме паразита. Описан новый подход к созданию лекарственных препаратов, основанный на использовании пролекарственных форм модифицированных нуклеозидов, которые в результате метаболических процессов конвертируются в эффективный лекарственный препарат непосредственно в целевом органе или ткани. Такая стратегия позволяет уменьшить общую токсичность препарата для человека и увеличить эффективность его действия на клетки, пораженные вирусом.

Ключевые слова: биосинтез нуклеозидов, антибактериальная активность, противовирусная активность, антипротозойная активность, PHK-вирусы, SARS-CoV-2, ферменты-мишени, гидрофобные производные нуклеозидов

DOI: 10.31857/S0026898421050104

введение

Быстро мутирующие РНК-содержащие вирусы представляют серьезную опасность для человечества. Пандемия COVID-19, вызванная новым коронавирусом тяжелого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) в 2020 году, обнажила проблему нехватки универсальных противовирусных средств. Вирусы относятся к облигатным парази-

¹ Этот обзор посвящен памяти доктора химических наук, профессора Сергея Николаевича Михайлова (1949–2020 гг.) – выдающегося ученого, наставника и учителя. Вся научная жизнь С. Н. Михайлова связана с Институтом молекулярной биологии РАН. С 1995 г. по 2020 г. он возглавлял лабораторию дизайна и синтеза биологически активных соединений. Он внес большой вклад в развитие энзимологии и химии нуклеозидов. Последние годы жизни С.Н. Михайлов посвятил конструированию новых противовирусных агентов на основе нуклеозидов и их аналогов.

Сокращения: ННЙОТ – ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; ОТ – обратная транскриптаза; Φ РП Φ – 5фосфорибозил-1-пирофосфат; CMV (cytomegalovirus) – цитомегаловирус; HBV (hepatitis B virus) – вирус гепатита B; HCV (hepatitis C virus) – вирус гепатита C; HSV (herpes simplex virus) – вирус простого герпеса; IMPDH (inosine-5'-monophosphate dehydrogenase) – инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа; MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus) – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома; PfPNP (*Plasmodium falciparum* purine-nucleosidephosphorylase) – пуриннуклеозидфосфорилаза из *Plasmodium falciparum*; RdRp – PHK-зависимая PHK-полимераза; SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus) – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома; VZV (varicella zoster virus) – вирус варицелла-зостер.

там, геном которых кодирует минимальный набор ферментов и белков, необходимых для репликации и сборки вирусных частиц. Для биосинтеза строительных блоков (мономеров) используются ферменты клетки, поэтому воспроизведение вируса возможно только в инфицированной им клетке. Можно выделить два основных типа противовирусных препаратов: первые препятствуют проникновению вируса в клетку, вторые нарушают репликацию вирусного генома в зараженной клетке. Аналоги нуклеозидов могут быть активными противовирусными средствами, причем механизм их действия зависит от типа и положения заместителей. Огромный интерес к созданию противовирусных лекарственных препаратов не ограничивается рассмотрением классических подходов, а по мере появления новых технологий получают развитие и новые направления в этой области [1-5].

Лекарственные средства на основе нуклеозидов используют и для лечения инфекционных заболеваний, вызываемых бактериями, простейшими и грибами. Возникновение резистентности у патогенных микроорганизмов к применяемым препаратам — это серьезная проблема, с которой столкнулось человечество из-за повсеместного, далеко не всегда оправданного, использования антибиотиков. Именно поэтому разработка новых противомикробных средств была и остается актуальной. В обзоре мы обсуждаем и стратегию поиска антипротозойных соединений для лечения социально значимых инфекционных заболеваний [6–9].

Создание лекарственных препаратов на основе природных соединений – классический подход, который хорошо себя зарекомендовал. К настоящему времени на основе нуклеозидов создано около ста лекарственных препаратов, причем половина из них относится к противовирусным и четверть — к противоопухолевым препаратам [10]. Природные нуклеозиды имеют разнообразную структуру, они входят в состав нуклеотидов, ДНК, РНК, коферментов. Только из тРНК выделено более 140 минорных нуклеозидов, а из различных природных источников - около 100 дисахаридных нуклеозидов и 200 нуклеозидных антибиотиков, в структуре которых имеются дополнительные функциональные группы и гидрофобные остатки. Библиотека природных нуклеозидов содержит около 600 соединений, которые служат основой для создания новых биологически активных соединений [11].

В предлагаемом обзоре стратегии создания противовирусных и противопаразитарных препаратов проанализированы в контексте особенностей метаболизма нуклеозидов в различных организмах. Детально рассмотрены те особенности структуры аналогов нуклеозидов, которые определяют механизм их лекарственного действия.

МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОЗИДОВ – КЛЮЧ К ПОНИМАНИЮ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

В отличие от большинства лекарственных препаратов нуклеозиды и их аналоги в организме человека сначала подвергаются действию ряда ферментов клеточного метаболизма, которые переводят их в активные формы (нуклеотиды). Схема метаболизма различных модифицированных нуклеозидов на начальном этапе после попадания в организм довольно консервативна. Эти соединения обычно проникают в клетки и в результате ферментативного фосфорилирования последовательно превращаются в нуклеозид-5'-моно-, ди- и трифосфаты (NMP, NDP и NTP соответственно). Эти метаболиты затем ингибируют один или несколько ферментов биосинтеза ДНК или РНК (в том числе вирусные полимеразы). В клетке соотношения нуклеозидфосфатов (NMP: NDP: NTP) для производных разных нуклеозидов отличаются. Оно зависит от скорости фосфорилирования исходного нуклеозида. Первая стадия фосфорилирования (образование NMP) обычно скоростьлимитирующая и, следовательно, наиболее важная для активации. В целом равновесие нуклеозид N \leftrightarrow NTP в клетке сдвинуто в сторону образования трифосфатов. Также следует отметить, что концентрации NTP в клетке значительно превышают концентрации NMP, NDP, а также нуклеозидов, участвующих в метаболических процессах, необходимых для роста, поддержания жизнедеятельности организма и для его воспроизведения (табл. 1) [12]. Эти превращения неразрывно связаны с биосинтезом нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот в клетке, поэтому знание особенностей биосинтеза нуклеотидов - ключ

Таблица 1. Концентрации метаболитов, участвующих в биосинтезе пуриновых нуклеозидов^а

Метаболит	С ^ь , мкМ
ATP	2102
GTP	305
ADP	137
GDP	36
AMP	82
GMP	32
Ado	0.5
Guo	0.9
Ade	0.4
Gua	97

^аВ таблице обобщены данные, приведенные в обзоре Traut T.W. [12]. ^bКонцентрации нуклеотидов измерены в клетках крови человека, концентрации оснований и нуклеозидов измерены во внеклеточной жидкости.



Биосинтез пуринов

Биосинтез пиримидинов

Рис. 1. Биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов/нуклеотидов. Цифрами обозначены ферменты. Биосинтез пуринов: 1) фосфорибозилпирофосфат-синтетаза (ЕС 2.7.6.1); 2) амидофосфорибозилтрансфераза (ЕС 2.4.2.14); 3) фосфорибозиламин-глицин-лигаза (ЕС 6.3.4.13), фосфорибозилглицинамидформилтрансфераза (ЕС 2.1.2.2), фосфорибозилформилглицинамидинсинтетаза (ЕС 6.3.5.3), фосфорибозилформилглицинамидин-циклолигаза (ЕС 6.3.3.1), фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилаза (ЕС 4.1.1.21), 5-(карбоксиамино)имидазол-рибонуклеотидмутаза 4.1.1.21). 5-(карбоксиамино)имидазол-рибонуклеотидмутаза (ЕС 5.4.99.18), фосфорибозиламиноимидазолсукцинокарбоксамидсинтетаза (ЕС 6.3.2.6), аденилосукцинатлиаза (ЕС 4.3.2.2), фосфорибозиламиноимидазолкарбоксамидформилтрансфераза (ЕС 2.1.2.3); 4) аденилосукцинатсинте-таза (ЕС 6.3.4.4); 5) аденилосукцинатлиаза (ЕС 4.3.2.2); 6) аденилаткиназа (ЕС 2.7.4.3); 7) нуклеозиддифосфаткиназа (ЕС 2.7.4.6); 8) аденилатнуклеозидаза (ЕС 3.2.2.4); 9) аденинфосфорибозилтрансфераза (ЕС 2.4.2.7); 10) пуриннуклеозидфосфорилаза (ЕС 2.4.2.1); 11) аденозиндезаминаза (ЕС 3.5.4.4); 12) гуанозин-инозинкиназа (ЕС 2.7.1.73); 13) пуриннуклеозидфосфорилаза (ЕС 2.4.2.1); 14) инозин-5'-монофосфат-дегидрогеназа (ЕС 1.1.1.205); 15) гуанилатсинтетаза (ЕС 6.3.5.2); 16) гуанилаткиназа (ЕС 2.7.4.8); 17) нуклеозидлифосфаткиназа (ЕС 2.7.4.6); 18) гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (ЕС 2.4.2.8); 19) пуриннуклеозидфосфорилаза (ЕС 2.4.2.1); 20) гуанозин-инозинкиназа (EC 2.7.1.73); 21) гуаниндезаминаза (EC 3.5.4.3); 22) пуриннуклеозидфосфорилаза (EC 2.4.2.1); 23) ксантингуанинфосфориботрансфераза (ЕС 2.4.2.22); 24) гуанозин-инозинкиназа (ЕС 2.7.1.73); 25) гуанозин-5'-монофосфатредуктаза (ЕС 1.7.1.7); 26) гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (ЕС 2.4.2.8); 27) рибонуклеозиддифосфатредуктаза (ЕС 1.17.4.1); 28) нуклеозиддифосфаткиназа (ЕС 2.7.4.6); 29) рибонуклеозиддифосфатредуктаза (ЕС 1.17.4.1); 30) нуклеозиддифосфаткиназа (ЕС 2.7.4.6). Биосинтез пиримидинов: 1) карбамоилфосфатсинтаза (ЕС 6.3.5.5); 2) аспартаткарбамоилтрансфераза (ЕС 2.1.3.2), дигидрооротаза (ЕС 3.5.2.3), дигидрооротат-дегидрогеназа (ЕС 1.3.99.11); 3) оротат-фосфорибозилтрансфераза (ЕС 2.4.2.10); 4) оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза (ЕС 4.1.1.23); 5) уридилаткиназа (EC 2.7.4.22); 6) нуклеозиддифосфаткиназа (EC 2.7.4.6); 7) цитидин-5'-трифосфат-синтаза (EC 6.3.4.2); 8) рибонуклео-зиддифосфатредуктаза (EC 1.17.4.1); 9) нуклеозиддифосфаткиназа (EC 2.7.4.6); 10) дезоксиуридинтрифосфатдифосфатаза (ЕС 3.6.1.23); 11) тимидилатсинтаза (ЕС 2.1.1.45); 12) тимидилаткиназа (ЕС 2.7.4.9); 13) нуклеозиддифосфаткиназа (EC 2.7.4.6); 14) уридин-цитидинкиназа (EC 2.7.1.48); 15) нуклеозиддифосфаткиназа (EC 2.7.4.6); 16) дезоксицитидин-5'-трифосфат-дезаминаза (ЕС 3.5.4.13); 17) цитидилаткиназа (ЕС 2.7.4.14); 18) нуклеозиддифосфаткиназа (ЕС 2.7.4.6); 19) нуклеозидгидролаза (ЕС 3.2.2); 20) цитозиндезаминаза (ЕС 2.4.2.4); 10) нуклеозидгидродаза (ЕС 3.2.2); 20) цитозиндезаминаза (ЕС 3.5.4.5); 23) уридин-цитидинкиназа (ЕС 2.4.2.4); 24) уридинфосфорибазилтрансфераза (ЕС 2.4.2.3); 25) цитидиндезаминаза (ЕС 3.5.4.5); 26) тимидинкиназа (ЕС 2.4.2.4); 27) тимидинфосфорилаза (ЕС 2.4.2.4); 28) тимидинфосфорилаза (ЕС 2.4.2.4). Обозначения: ФРПФ – 5-фосфорибозил-1-пирофосфат; ІМР – инозин-5'-монофосфат; ОМР – оротидин-5'-монофосфат; sAMP – аденилосукцинат; ХМР – ксантозин-5'-монофосфата; Хао – ксантозин, Хап – ксантин; Thy – тимин; Thd – тимидин, Нур – гипоксантин. Упрощенная схема биосинтеза составлена на основании данных по метаболическим превращениям нуклеозидов/нуклеотидов [12-14].

к пониманию механизма действия биологически активных производных нуклеозидов.

Пути биосинтеза нуклеозидов

Биосинтез пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и нуклеотидов (рис. 1) реализуется в организме двумя путями. Основной путь (*de novo*) представляет собой сложный, многоступенчатый и энергоемкий процесс образования гетероцикличе-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

ских оснований в присутствии различных доноров углерода и азота с последующим формированием из них нуклеозидов. Дополнительный путь биосинтеза нуклеозидов, "реутилизационный" (salvage pathways), позволяет клеткам повторно использовать свободные азотистые основания, которые образуются в результате ферментативного расщепления нуклеозидов в обменных процессах. Это обеспечивает экономичность метаболизма в организме.

Ключевая реакция биосинтеза de novo пуриновых нуклеотидов – образование 5-фосфорибозил-1-амина в результате переноса амидной группы глутамина на 5-фосфорибозил-1-пирофосфат (ФРПФ) под действием амидофосфорибозилтрансферазы. Далее осуществляется сборка пуринового гетероциклического основания на основе 5-фосфорибозил-1-амина при участии различных доноров углерода и азота с образованием инозин-5'-монофосфата (ІМР) – метаболического предшественника пуриновых нуклеотидов. IMP метаболизируется в AMP и GMP через образование промежуточных соединений: аденилосукцината (sAMP) и ксантозин-5'-монофосфата (ХМР) – с последующим фосфорилированием специфическими нуклеозилмонофосфат- и нуклеозиддифосфаткиназами до активных трифосфатных форм (ATP и GTP) [13] (см. "Биосинтез пуринов" на рис. 1).

В отличие от синтеза пуринов пиримидиновое гетероциклическое основание изначально синтезируется на основании глутамина, СО₂ и АТР с образованием карбамоилфосфата. В ходе ряда превращений образованная из карбамоилфосфата оротовая кислота связывается с рибозо-5'-фосфатом под действием оротатфосфорибозилтрансферазы с образованием оротидин-5'-монофосфата (ОМР) – исходного субстрата для биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов de novo (см. "Биосинтез пиримидинов" на рис. 1). Дальнейшее декарбоксилирование приводит к образованию промежуточного продукта биосинтеза – уридин-5'-монофосфата (UMP), который в результате последовательного фосфорилирования превращается в активный уридин-5'-трифосфат (UTP). UTP участвует в образовании цитидин-5'-трифосфата (СТР) под действием цитидин-5'-трифосфатсинтазы, катализирующей амилирование UTP путем ATP-зависимого замещения кетогруппы урацила на амидную группу глутамина [13, 14].

Дезоксирибонуклеотиды (dATP, dGTP и dCTP), включаемые в состав ДНК, образуются de novo из рибонуклеозид-5'-дифосфатов под действием рибонуклеозиддифосфатредуктаз и нуклеозиддифосфаткиназ (рис. 1). Тимидин-5'-трифосфат (dTTP) образуется в серии ферментативных реакций, включающих превращение дезоксиуридин-5'-трифосфата (dUTP) в дезоксиуридин-5'-монофосфат (dUMP) под действием дезоксиуридинтрифосфатазы, метилирование dUMP с образованием dTMP, катализируемое тимидилатсинтазой, и последовательное фосфорилирование dTMP нуклеотидкиназами. Большая часть dUTP (около 75%), используемая для синтеза dTTP, образуется в результате дезаминирования dCTP под действием дезоксицитидинтрифосфат-дезаминазы, а не непосредственно из UDP под действием рибонуклеотидредуктазы и нуклеозиддифосфаткиназы [13].

"Реутилизационный" путь биосинтеза основан на присоединении молекулы ФРПФ к свободному азотистому основанию (образующемуся в результате распада нуклеиновых кислот и последующего ферментативного расщепления нуклеотидов), при этом ФРПФ-зависимое фосфорибозилирование пуринов катализируют аденинфосфорибозилтрансфераза, ответственная за образование АМР из аденина. и гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза, катализирующая образование IMP и GMP из гипоксантина и гуанина соответственно. Для пути "реутилизации" одна из основных стадий - сопровождающееся фосфоролизом расщепление *N*-гликозидной связи пуриновых нуклеозидов пуриннуклеозидфосфорилазой, а пиримидиновых нуклеозидов – пиримидиннуклеозидфосфорилазой и уридинфосфорилазой. Все эти ферменты, катализируют обратимое расщепление гликозидной связи соответствующих рибо- и дезоксирибонуклеозидов в присутствии неорганического фосфата с образованием гетероциклического основания и рибозо/дезоксирибозо-1-фосфата. Термодинамическое равновесие реакций смещено в сторону синтеза нуклеозидов [15], причем в случае пуриновых нуклеозидов более значительно [16]. Ключевой фермент фосфоролиза пиримидиновых нуклеозидов – уридинфосфорилаза, катализирующая обратимое расщепление уридина, 2'-дезоксиуридина и тимидина до соответствующих гетероциклических оснований и рибозо-1-фосфата. Дальнейшее превращение нуклеозидов в нуклеотиды катализирует уридин-цитидинкиназа, фосфорилирующая уридин и цитидин до 5'-монофосфатных форм с одинаковой эффективностью [17].

Дополнительный путь биосинтеза пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов заключается в фосфорилировании тимидина до dTMP под действием тимидинкиназы. Ключевую роль играет и фосфоролитическое расщепление дезоксиуридина и тимидина под действием тимидинфосфорилазы; при этом термодинамическое равновесие смещено в сторону образования нуклеозидов [13].

Таким образом, метаболизм нуклеозидов/нуклеотидов представляет собой сложный многоступенчатый процесс, включающий большой набор ферментов и реакций, преобразующих нуклеотиды, нуклеозиды и азотистые основания. Обладая структурным сходством с природными субстратами, лекарственные соединения нуклеозидной природы могут влиять на разные стадии биосинтеза нуклеозидов.

Основные различия биосинтеза нуклеозидов de novo у разных организмов. Принципы создания антипаразитарных препаратов

Пуриновый и пиримидиновый биосинтез *de novo* есть у всех живых организмов всех трех до-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

менов: бактерий, архей и эукариот [18]. Пути биосинтеза у бактерий и эукариот практически одинаковы, а у архей отличаются [19]. В геномах бактерий и архей кластеры генов, кодирующих ферменты биосинтеза de novo, организованы поразному [20, 21]. Регуляция транскрипции этих генов также различается [19, 20]. Но ферменты, участвующие в биосинтезе, у бактерий и архей одинаковы, в то время как у некоторых эукариот ряд ферментов биосинтеза de novo отличается [18]. Так, у дрожжей Saccharomyces cerevisiae активные центры карбамоилфосфатсинтетазы (CPSase; ЕС 6.3.5.5) и аспартаткарбамоилтрансферазы (ATCase; EC 2.1.3.2) встроены в общую полипептидную цепь, которая содержит также неактивный вариант дигидрооротазы (DHOase; EC 3.5.2.3). Для пиримидинового биосинтеза клетки млекопитающих используют трифункциональный белок дигидрооротатсинтетазу, который содержит в одной полипептидной цепи три активных центра, выполняющих поочередно функции CPSase, ATCase, и DHOase [18, 20], и бифункциональный белок, в полипептидную цепь которого встроены активные центры оротатфосфорибозилтрансферазы (OPRTase; EC 2.4.2.10) и оротодин-5'-монофосфат-декарбоксилазы (OMPdecase; EC 4.1.1.23) [20]. Ферменты пиримидинового биосинтеза у низших эукариот находятся в митохондриях, а у млекопитающих – в цитозоле клеток [18, 20], что обеспечивает максимальную компактность реакционного пространства при синтезе *de novo* в клетках млекопитающих. Биосинтез de novo на 95% обеспечивает клетки нуклеотидами IMP и UMP [18]. Вирусы и фаги, как инфекционные агенты, размножающиеся только в живых клетках, используют в своем инфекционном цикле синтезированные хозяином нуклеозиды/нуклеотиды [22].

В процессе эволюции некоторые организмы утратили часть генов, необходимых для пуринового либо пиримидинового синтеза de novo. Это ауксотрофы — их существование возможно только при наличии в питательной среде производных пуринов/пиримидинов. Они могут паразитировать в других организмах, в частности в организме человека, вызывая различные заболевания. Ключевое значение для них имеет "реутилизационный" путь биосинтеза нуклеозидов. Следовательно, ферменты, катализирующие реакции дополнительного пути нуклеотидного обмена (среди них нуклеозидфосфорилазы), можно рассматривать в качестве мишеней для создания антибактериальных и антипротозойных лекарственных средств [23-26]. К пуриновым ауксотрофам относятся такие организмы, как гельминт Schistosoma mansoni, вызывающий у человека эндемическое заболевание – шистосомоз [25, 26], и малярийный плазмодий, *Plasmodium falciparum*, — возбудитель тяжелой формы малярии [23, 24]. К пиримидиновым ауксотрофам относится жгутиковый протист

Giardia lamblia [27-29], который может паразитировать в тонком кишечнике млекопитающих и птип. вызывая заболевание лямблиоз. Поиск эффективных и высокоспецифичных ингибиторов нуклеозидфосфорилаз - одна из стратегий создания препаратов для лечения заболеваний, вызываемых перечисленными паразитами. На этом пути уже достигнуты определенные результаты. Детально были исследованы производные иммуциллина (рис. 2), конформация которых близка предполагаемой переходной конформации субстрата пуриннуклеозидфосфорилаз [30, 31]. Ранее сообщалось, что 5'-метилтиоиммуцилин-Н (5'-methylthio-immucillin-H; 5'-MT-ImmH) связывается с пуриннуклеозидфосфолазой Plasmodium falciparum (PfPNP) в 112 раз эффективнее, чем с пуриннуклеозидфосфорилазой эритроцитов человека (K_d 2.7 и 303 нМ соответственно). Скорее всего, это обусловлено различным строением активных центров этих двух пуриннуклеозидфосфорилаз [31]. Предложено использовать 5'-МТ-ІттН в качестве ингибитора PfPNP при лечении малярии у человека [9, 31, 32]. Другое производное иммуциллина, DADMe-Immucillin-G (BCX4945), в настоящее время проходит доклинические испытания. Уже продемонстрирована его высокая эффективность при лечении малярии на модели обезьян [33]. Структура его комплекса с пуриннуклеозидфосфорилазой эритроцитов человека исследована методом ЯМР [34].

МЕХАНИЗМ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ НУКЛЕОЗИДОВ

Ингибиторы полимераз

Механизм биологической активности большинства противовирусных лекарственных препаратов на основе нуклеозидов и их аналогов связан с их внутриклеточным превращением в 5'-моно-, ди- и трифосфаты под действием вирусных и клеточных киназ с последующим включением в нуклеиновые кислоты, что приводит к ингибированию репликации вирусного генома [3]. Геном вируса кодирует ряд белков и ферментов, необходимых для размножения вируса в инфицированной клетке, при этом поддержание жизненного цикла вируса осуществляется за счет метаболических путей клетки-хозяина с вовлечением соответствующих ферментов.

Вирусные ферменты, участвующие в репликации вирусных нуклеиновых кислот, представлены РНК-зависимой РНК-полимеразой (РНК-содержащие вирусы), РНК-зависимой ДНК-полимеразой (ретровирусы), ДНК-зависимой ДНКполимеразой и ДНК-зависимой РНК-полимеразой для ДНК-содержащих вирусов. Вирусы простого герпеса (HSV), помимо ДНК-полимеразы как основного фермента репликации, кодируют



Рис. 2. Структуры иммуциллинов.

тимидинкиназу, которая в клетке осуществляет 5'-монофосфорилирование нуклеозидов и их аналогов [35]. Вирусные ферменты обладают, как правило, меньшей специфичностью, чем ферменты клетки-хозяина, что обусловливает высокую скорость размножения вирусов и быстрое развитие устойчивости к действию лекарственных препаратов.

Действие нуклеозидов и их аналогов может быть нацелено на ингибирование синтеза нуклеиновых кислот вирусов, увеличение частоты летальных мутаций вирусных геномов (летальный мутагенез), возможны и другие механизмы их действия, направленные на ингибирование биосинтеза нуклеозидов [4]. У вирусов в синтезе нуклеиновых кислот участвуют ферменты, отличные от клеточных: ДНК-зависимая ДНК-полимераза, РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза, ОТ), РНК-зависимая РНК-полимераза. Нуклеозидные аналоги в форме NTP нацелены на подавление синтеза вирусных РНК/ДНК различными путями, которые представлены на рис. 3.

Любой модифицированный нуклеозид-5'-трифосфат может ингибировать синтез нуклеиновых кислот либо как конкурентный ингибитор включения природного NTP в растущую цепь нуклеиновой кислоты (рис. 3*a*), либо как терминатор роста цепи за счет встраивания нуклеозид-5'-трифосфата, не содержащего гидроксильной группы в 3'-положении, в растущую цепь РНК/ДНК (рис. 3*б*). В качестве терминаторов роста цепи могут выступать также нуклеозид-5'-трифосфаты, содержащие стерически малодоступную для протекания ферментативной реакции гидроксильную группу в 3'-положении. Например 3'-метил-UTP, который представляет собой терминирующий субстрат РНК-полимеразы *Escherichia coli*, может быть использован для секвенирования нуклеиновых кислот. В этом соединении 3'-метильная группа, которая замещает протон, существенно уменьшает реакционную способность 3'-гидроксильной группы [36, 37].

Возможно также кинетическое терминирование роста цепи нуклеиновой кислоты - когда модифицированный нуклеозид-5'-трифосфат может быть встроен в растущую цепь, но скорость его включения и последующая элонгация цепи сильно замедлены в сравнении с природным NTP. Кинетическое терминирование может быть результатом внутримолекулярных или межмолекулярных стерически неоптимальных взаимодействий фермента с модифицированным нуклеозид-5'-трифосфатом, а также нарушением водородных связей между матрицей и праймером (рис. 3в). В результате синтез цепи нуклеиновой кислоты останавливается. Это явление было впервые описано на рубеже 90-х годов XX века [37-39]. В условиях односубстратной реакции, когда к предсинтезированной праймерной РНК вместе с природным UTP добавляли D-алло-диастереомер или *L*-тало-диастереомер 5'-метил-UTP (5'-аМе-UTP и 5'-tMe-UTP), 5'-аMe-UTP включался примерно в 100 раз, а 5'-tMe-UTP – в 1000 раз менее эффективно, чем природный субстрат UTP [38, 39]. В отсутствие UTP, природного субстрата РНКполимеразы, к предсинтезированной РНК в этом



Рис. 3. Основные пути действия лекарственных препаратов нуклеозидной природы на синтез вирусных РНК/ДНК. Трифосфатная форма аналога нуклеозида может выступать в качестве ингибитора РНК/ДНК-полимеразы (*a*), терминатора роста цепи РНК/ДНК (*б*), кинетического терминатора (*в*), а также действовать по механизму летального мутагенеза (*г*). Обозначения: N-киназа – нуклеозидкиназа; НК – нуклеиновая кислота; М – мутация; pppM – аналог нуклеозид-5'-трифосфата; pppN – природный нуклеозид-5'-трифосфат; В – гетероциклическое основание; R = H, OH; R' = H, OH.

случае присоединялось не более двух 5'-С-метилуридиновых остатков, то есть эффективность последующего включения аналогов снижалась еще в большей степени по сравнению с условиями, в которых к ферменту добавляли смесь UTP и 5'-aMe-UTP или 5'-tMe-UTP [38, 39].

Еще один механизм антивирусной активности соединений на основе нуклеозидов – это "летальный мутагенез". Мутации при включении модифицированного нуклеозида в цепь РНК/ДНК могут приводить к образованию нежизнеспособных штаммов вируса (рис. 3г) [40]. Кроме того, наличие в клетке модифицированных нуклеозидов, а также соответствующих им NMP, NDP и NTP, может вызывать ингибирование биосинтеза нуклеиновых кислот за счет изменения концентраций природных NMP, NDP и NTP и их соотношений. Ниже рассмотрены основные механизмы действия ряда известных лекарственных препаратов.

Большинство нуклеозидных/нуклеотидных аналогов лекарственных препаратов, используемых в

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

качестве противовирусных агентов, действуют как ингибиторы и терминаторы синтеза ДНК или РНК [2, 5].

Клинически одобренные лекарственные препараты ацикловир, ганцикловир, пенцикловир (табл. 2), представляющие собой ациклические аналоги нуклеозидов, а также их пролекарства, увеличивающие пероральную биодоступность (валацикловир, валганцикловир и фамцикловир), активны в отношении ДНК-содержащих вирусов: HSV и цитомегаловируса (CMV) [1]. Эти лекарственные препараты ингибируют полимеразы HSV и CMV, а также терминируют репликацию, действуя в форме трифосфатов. Геномы вирусов семейства Herpesviridae кодируют ряд ферментов метаболизма нуклеиновых кислот: тимидинкиназу, тимидилатсинтазу, дезоксиуридинтрифосфатазу и рибонуклеотидредуктазу [35]. Наибольший интерес с точки зрения внутриклеточной активации нуклеозидов и их аналогов представляет тимидинкиназа, катализирующая первую, скоростьлимитирующую, стадию – монофосфорилирование.

Тимидинкиназа HSV не относится к высокоспецифичным ферментам, поэтому может фосфорилировать не только тимидин, но и аналоги пуриновых нуклеозидов. Лекарственные препараты, одобренные Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для лечения HSV, ацикловир и пенцикловир после проникновения в клетку фосфорилируются вирусными тимидинкиназами, до соответствующих монофосфатов [41-45]. Последующее двухступенчатое фосфорилирование ферментами клетки-хозяина: гуанилаткиназой и нуклеозиддифосфаткиназой – приводят к образованию их трифосфорилированных форм, которые конкурируют с природным субстратом dGTP за встраивание в ДНК и блокируют ее синтез [41]. Ганцикловир-5'-трифосфат и валганцикловир-5'-трифосфат включаются в вирусную ДНК и блокируют репликацию вируса, "работая" как кинетические терминаторы [43].

Аналог пуринового нуклеозида видарабин (табл. 2), нацеленный на HSV и вирус варицеллазостер (VZV), в активной 5'-трифосфатной форме останавливает репликацию вирусной ДНК по механизму конкурентного ингибирования вирусной ДНК-полимеразы, замещая dATP [46].

Следует отметить, что наряду с основным механизмом действия аналогов нуклеозидов для них известны другие пути и мишени (рибонуклеозидредуктаза, полиаденилирование РНК и S-аденозилгомоцистеингидролаза) [43]. Механизм противовирусного действия аналогов 2'-дезоксиуридина (идоксуридин, трифлуридин; табл. 2) подробно не изучен. Предполагается, что эти соединения ингибируют синтез ДНК вирусов герпеса. После монофосфорилирования вирусными специфичными тимидинкиназами, а затем клеточными киназами до 5'-трифосфатных форм эти лекарственные препараты конкурируют с dTTP за встраивание в вирусную ДНК [47]. После монофосфорилирования вирусными тимидинкиназами 5-(трифторметил)-2'-дезоксиуридин-5'-монофосфат необратимо ингибирует тимидилатсинтазу, а его трифосфат конкурирует с dTTP за включение в цепь ДНК, синтезируемую ДНК-полимеразой [43]. Механизм действия другого аналога 2'-дезоксиуридина – бривудина (лекарственный препарат одобрен для лечения вируса герпеса в ряде европейских стран) - заключается в кинетическом терминировании синтеза ДНК вирусов HSV-1 и VZV [47-50].

В качестве терминаторов репликации вирусов выступают также ациклические нуклеозидфосфонатные аналоги (цидофовир, адефовир дипивоксил, тенофовир дизопроксил фумарат; табл. 2), механизм действия которых основан на наличии фосфонатной связи (–РСО–) вместо обычной фосфатной (–РОС–). Это характерная особенность нуклеотидных аналогов, активных в отношении полимераз СМV, ВИЧ и вируса гепатита В (HBV) [51]. Эти препараты изначально фосфорилируются клеточными киназами до фосфонодифосфатных форм, поскольку их фосфонатная группа имитирует 5'-монофосфат в нуклеотидах. Как и в случае других модифицированных нуклеозид-5'-трифосфатов, они конкурентно ингибируют включение природного субстрата в растущую цепь ДНК и, как следствие, активность ДНК-полимеразы. Фосфонатная связь, в отличие от фосфатной, не может быть расщеплена фосфодиэстеразой, что обеспечивает высокую устойчивость этих соединений в клетке [52, 53].

Лекарственные препараты адефовир и тенофовир способны обходить первую лимитирующую стадию фосфорилирования во внутриклеточном метаболизме нуклеозидных аналогов. В лифосфорилированных формах алефовир и тенофовир действуют в качестве альтернативных субстратов и терминаторов цепи в реакции синтеза ДНК, катализируемой обратной транскриптазой ВИЧ (ОТ-ВИЧ) [54–56]. Ингибирующее действие адефовира и тенофовира на репликацию HBV может быть связано с терминированием роста цепи вирусной ДНК в присутствии ОТ. Алефовир и тенофовир в виде дифосфатов, очевидно, обладают большей аффинностью к ОТ-ВИЧ (и ОТ-HBV), чем к клеточным ДНК-полимеразам α , β, γ, δ и ε [57, 58], и это может объяснить их селективность в отношении ретровирусов и гепаднавирусов.

Все препараты в группе нуклеозидных ингибиторов ОТ-ВИЧ (зидовудин, диданозин, зальцитабин, ставудин, ламивудин, абакавир, эмтрицитабин; табл. 2), известные как 2',3'-дидезоксинуклеозидные аналоги, в виде 5'-трифосфатов терминируют синтез вирусной ДНК. Механизм их действия заключается в конкуренции с природными субстратами за встраивание в вирусную ДНК, синтезируемую ОТ-ВИЧ. Встроившись, они терминируют рост цепи вследствие отсутствия 3'-ОН группы [59].

Недавно сообщалось, что ОТ ретровирусов и гепаднавирусов имеют сходную структуру нуклеотидсвязывающего кармана [60]. Вот почему аналоги нуклеозидов, ингибирующие репродукцию ВИЧ: ламивудин и эмтрицитабин, — оказываются эффективными и для лечения пациентов с гепатитом В.

Механизм действия других нуклеозидных препаратов (телбивудин и энтекавир; табл. 2) против HBV также заключается в каскаде трифосфорилирования исходных нуклеозидов с последующим ингибированием полимеразы HBV. Хотя телбивудин содержит 3'-OH группу, обеспечивающую удлинение цепи вирусной ДНК, альтернативный механизм действия может заключаться в терминации роста цепи ДНК [2]. Энтекавир-5'-

Табл	ища 2. Против	овирусные лекарственные препараты нук	леозидной при	роды [1, 2, 41—45,	, 47, 50, 51, 54–59, 61, 62	2, 65–101]	
Š	Вирус	Лекарственный препарат	Молекуля _] IC ₅₀ (<i>k</i>	рная мишень $\frac{1}{4}$ или $K_{\mathrm{d}})^{\mathrm{a}}$	EC_{50}^{b}	Токсичность и побочные эффекты	Статус препарата
		І. Конкурент	ные ингибиторь	і вирусной ДНК-по	олимеразы		
		Видарабин (Vira-A®) NH ₂ N	ДНК-поли- мераза	62.7 ± 8.6 мкМ° [90]	34.7 ± 2.4 мкМ (HSV-1/Vero) [90]		
1	HSV, VZV	N N O OH	E		42.1 ± 1.8 мкМ (HSV-2/Vero) [90]	LD ₅₀ ^d > 5 020 мг/кг (крысы) [86]	Одобрен 1976 г.
		НООН	Іимидин- киназа	I	1.6±0.4 мкМ (VZV/HEL) [91]		
		Телбивудин (Туzeka®) О					
5	HBV	HOONO	Полимераза НВV	243 ± 9 нМ ^е [61]	8.950 ± 4.803 нМ [61]	Не описано [86]	Одобрен 2006 г.
		Но					
		ІІ. Конкурентные ингибито	ры вирусной ДН	К-полимеразы и т	нерминаторы роста цеп	п	
		Ацикловир (Acyclovir®) С	ДНК-поли- мераза	$K_{ m d}$ $6 \pm 1 { m McM}^{ m e}$ (HSV) [92]	<0.56–3.3 мкМ (HSV/Vero) [85]	Возбуждение, кома,	
ω	HSV, VZV	HO N NH2 N NH2 NH2	Тимидинки- наза	I	3.78 ± 0.58 мкМ (HSV-1/Vero) [90] 8 ± 0.44 нМ (VZV/HEL) [91]	судороги, вялость, осадок в почечных канальцах [86]	Одобрен 1982 г.

65-S 5 50 54-5 50 47 45 ÷ c

905

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

Статус препарата	Одобрен 1993 г.	Одобрен 1995 г.	Одобрен 1994 г.
Токсичность и побочные эффекты	Головная и эпига- стральная боль, повышение уровня сывороточной липазы, тошнота, диспепсия, голово- кружение, гиперби- лирубинемия [86]	LD ₅₀ = 903.5 мг/кг (крысы) [86]	
EC ₅₀ ^b	0.16–1.97 мкМ (HSV-1/WISH), 0.79–2.37 мкМ (HSV-1/MRC-5), 0.39–3.16 мкМ (HSV-2/WISH), 3.55–8.29 мкМ (HSV-2/MRC-5) [93]	0.09—60 мкМ(HSV-1) 0.04—44 мкМ (HSV-2) 0.53—48 мкМ (VZV) [85]	1.2–2.6 мкМ (HSV-1/2) 6.7–71 мкМ (VZV) [93]
ная мишень или $K_{ m d})^{ m a}$	Ι	I	I
Молекуляр IC ₅₀ (K _i ДНК-поли- мераза, наза		ДНК-поли- мераза, тимидинки- наза	ДНК-поли- мераза, тимидинки- наза
Лекарственный препарат	Пенцикловир (Denavir®) $\begin{pmatrix} O \\ O \\ N \end{pmatrix} \end{pmatrix} $ $\begin{pmatrix} O \\ O \\ N \end{pmatrix} $ $HO $ $\begin{pmatrix} O \\ N \end{pmatrix} \end{pmatrix} $ NH_2 $HO $ $\begin{pmatrix} O \\ N \end{pmatrix} \end{pmatrix} $	Ba.rautuk.robup (Valtrex®)	Фамцикловир (Famvir®) N = N = N = N = N = N = N = N = N = N =
Вирус	ASH	HSV, VZV, CMV	HSV, VZV
Ÿ	4	Ś	9

Таблица 2. Продолжение

ЗЕНЧЕНКО и др.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

ъ и Статус ректы препарата	, Опоблен	ро- 1996 г.	ность Одобрен 2002 г.		я, 50ты 10чеч- 1989 г. 4-
Токсичност побочные эфф	Канцерогенез. Эритропения,	фопения, неф токсичность, тератогенност	Нефротоксич [86]	ы роста цепи	Панцитопени ухудшение раб ЖКТ, острая п ная недостато ность [86]
EC ₅₀ b	Мам 90 1-08 0	(HSV/Vero) [95]	2.636 ± 1.549 нМ (HBV/HepG2) [61]	loшантыдат өрүнөт	0.08—13.6 мкМ [93]
рная мишень і или K _d) ^a	6.6±0.8 мкМ ^f (CMV) [94]	I	31 ± 2.7 нМ ^f [61]	олимеразы и кине	I
Молекуля IC ₅₀ (К	ДНК-поли- мераза	Тимидинки- наза	Полимераза HBV	 юй РНК/ДНК-по	ДНК-поли- мераза, тимидинки- наза
Лекарственный препарат	Цидофовир (Vistide®) NH2 N	HOHO	Адефовир дипивоксил (Нерserа®)	III. Конкурентные ингибиторы вирусн	TanunkJobup (Zirgan®, Cytovene®, Vitrasert®) Cytovene®, Vitrasert®) HO NH NH
Вирус	HSV, CMV (v папиен-	спид)	HBV		CMV
Ÿ		7	×		6

Таблица 2. Продолжение

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6

Статус препарата	Одобрен 2001 г.	Одобрен 2000 г.	Одобрен 2005 г.	Одобрен 2013 г.
Токсичность и побочные эффекты	Нефротоксичность [86]	Ι	Не описано [86]	Головная боль, усталость, бради- кардия (редко) [86]
EC ₅₀ ^b	0.08—22.94 мкМ [93]	3.00—9.00 мМ (VZV) [50]	5.3 ± 2.5 нМ (HBV/HepG2) [61]	0.014—0.11 мкМ [85]
рная мишень или $K_{\rm d}$) ^а	I	I	0.5±0.1 нМ ^е [61]	0.7—2.6 мкМ ^е [85]
Молекуляр IC ₅₀ (К	ДНК-поли- Мераза, тимидинки- наза	ДНК-поли- мераза, тимидинки- наза	Полимераза НВV	РНК-зависи- мая РНК- полимераза (NS5B)
Лекарственный препарат	Валганцикловир (Valcyte®) H_2N 0 N NH2 H2N 0 N NH2	Бривулин ^ћ (Zostex®, Brivirac®) Вг – – – – – – – – – – – – – – – – – – –	Энтекавир (Baraclude®) $HO \xrightarrow{O}_{N} \xrightarrow{N}_{NH_2}$	Codoc6yBup (Sovaldi®)
Вирус	CMV	ΛZΛ	HBV	НСV
Š	10	=	12	13

Таблица 2. Продолжение

ЗЕНЧЕНКО и др.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

Статус препарата	Одобрен для экстрен-ного ис-пользова- ния в США (SARS-CoV-2) 2020 г.		Одобрен 1987 г.	Одобрен 1991 г.	Одобрен 1992 г.
Токсичность и побочные эффекты	Не описано [86]		LD ₅₀ = 3 084 мг/кг (перорально, мыши); усталость, головная боль, тош- нота, рвота [86]	Панкреатит, пери- ферическая нейро- патия, диарея, гиперурикемия, печеночная недо- статочность [86]	Передозировка >1.5 мг/кг; сыпь, лихорадка [86]
EC ₅₀ b	9.9 нМ (SARS-CoV-2/HAE), 280 нМ (SARS-CoV-2/CALU) [85]	оры роста цепи	0.01-0.49 мкМ (моноциты, лимфо- циты) [93]	2.5–10 мкМ (лимфобласты) 0.01–0.1 мкМ (моноциты, макро- фаги) [93]	30—500 нМ (лимфобласты, моноциты, лимофоциты) [85]
ная мишень или K _d) ^a	0.032 мкМ ^f (MERS-CoV) [85]	ВИЧ и терминат	270 ± 3.7 нМ ^е [96]	I	I
Молекуляр IC ₅₀ (<i>K</i> i	РНК-зависи- мая РНК- полимераза	нгибиторы ОТ-	ОТ-ВИЧ, ОТ-теломе- разы (ТЕRТ)	от-вич	ОТ-ВИЧ
Лекарственный препарат	PewlecnBup ⁱ (Veklury®)	IV. Конкурентные <i>и</i>	Зидовудин, Азидотимидин (Azidothymidin, Retrovir®) HO NHO NHO	Диданозин (Videx®) Но	Зальцитабин (Hivid®) ^{NH2} HOTON
Вирус	EBOV, MERS-CoV, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2		ВИЧ	ВИЧ	ВИЧ
ž	14		15	16	17

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

Таблица 2. Продолжение

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ И ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕОЗИДОВ

909

Ta6.	пица 2. Продол	жение					
Ž	Вирус	Лекарственный препарат	Молекуляр IC ₅₀ (<i>K</i> _i	зная мишень или K _d) ^a	EC ₅₀ b	Токсичность и побочные эффекты	Статус препарата
18	вич	Ставудин (Zerit®) Но	от-вич	0.0083—0.032 мкМ ^е [85]	0.009—4 мкМ (моноциты лимфобласты, одноядерные клетки) [85]	Периферическая нейропатия, жже- ние, онемение, боль в руках или ногах [86]	Одобрен 1994 г.
19	ВИЧ, НВV	Jамивудин (Epivir®) O^{N+2}	ОТ-ВИЧ, полимераза НВV	6.2±4.4 нМ ^е (HBV) [61]	1.491 ± 1.033 нМ (HBV) [61]	Головная боль, тошнота, недомога- ние, усталость, диа- рея, кашель [86]	Одобрен 1995 г.
20	ВИЧ	AGaxaBup (Ziagen®)	от-вич	I	0.26 ± 0.18 мкМ (лимфобласты, моноциты) [93]	Головная боль, недомогание, уста- лость, тошнота, рвота, нарушение сна [86]	Одобрен 1995 г.
21	ВИЧ, НВV	Эмтрицитабин (Emtriva®) $\stackrel{\text{Р}H_2}{} \stackrel{\text{Р}H_2}{} \stackrel{\text{Р}}{} \stackrel{\text{P}}{} \stackrel{\text{P}} \stackrel{\text{P}}{} \stackrel{\text{P}} \stackrel{\text{P}}{} \stackrel{\text{P}} \text$	от-вич	1	0.0013—0.64 мкМ (лимфобласты, MAGI-CCR5, одноядерные клетки периферической крови) [93]	Гепатотоксичность, ацидоз [86]	Одобрен 2003 г.

ЗЕНЧЕНКО и др.

Статус Препарата	Одобрен 2001 г. (ВИЧ), 2008 г. (НВV)			у- Одобрен - 1985 г. 5]	Одобрен в Японии в 2014 г. (вирус гриппа А, В, С); в России и (SARS-CoV-2)
Токсичность и побочные эффекти	Карциногенез [86]	мутагенез	LD ₅₀ = 2 700 mr/kr (kpblcbl) LD ₅₀ = 1 300 mr/kr (mbiiii)	Эритропения, нар. шение сна, раздра- жительность, ане- мия, нарушение функции печени (больные ВИЧ) [86	LD ₅₀ > 2 000 мг/кт (крысы) LD ₅₀ > 1 000 мг/кт (собаки, обезьяны У человека не опи- сано; у животных: угнетение гемато- поэза, эритропени влияние на функ- цию гелатоцитов, тератогенность [86
EC ₅₀ ^b	0.04-8.5 мкМ (ВИЧ/лимфобла- сты, моноциты, мак- рофаги, лимфоциты) [93] 2.482 ± 1.938 нМ (HBV) [61]	ы ІМРDH ⁱ + летальный		8.4 мкМ (HCV/Huh-7.5) [99]	0.43-0.61 мкМ (вирус гриппа А (H1N1)/MDCK) 1.34-1.97 мкМ (вирус гриппа А (H3N2)/MDCK) [100]
рная мишень или $K_{ m d})^{ m a}$	I	азы + ингибитори	<i>K</i> _i 200 мкМ ^g [98]	I	Ι
Молекуляр IC ₅₀ (K	ОТ-ВИЧ, полимераза НВV	й РНК-полимер	IMPDH	РНК-зависи- мая РНК- полимераза	РНК-зависи- мая РНК- полимераза
Лекарственный препарат	Тенофовир дизопроксил фумарат (Viread®)	V. Конкурентные ингибиторы вирусно	Рибавирин (Copegus®, Rebetol®, Virazole®) ОМН,	HO OH	Фавипиравир ^I (Avigan®) F / N / NH ₂
Вирус	ВИЧ, НВV		HCV RSV ^k	хантавирус, вирус гриппа	Вирус гриппа, SARS-CoV-2
Ž	22			23	24

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ И ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ НУКЛЕОЗИДОВ

911

Таблица 2. Продолжение

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

Олоблен	1963 r.	Олобоец	1980 r.
LD ₅₀ =3080 MT/KT	(мышы), типерчур- ствитель-ность глаз к свету [86]	LD ₅₀ = 2 946 мг/кг (крысы, внутри- венно),	LD ₅₀ > 4 379 мг/кг (перорально); по- давление функций костного мозга [86]
2.8 мкМ (HSV-1)	1101] 8.5-11.2 мкМ (BV) [101]	< 1.7 mkM (HSV-1)	1.7–3.4 мкМ (BV) [101]
I	1.5±0.2 мкМ ^т [101]	I	2.0±0.1 мкМ ^т [101]
ДНК-поли- мераза	Тимидинки- наза	Тимидилат- синтаза	Тимидинки- наза
Н _\ ́Н (⊛таридин (Herplex®)	ОСЛОН	Трифлуридин (Viroptic®) F	O N OH
	25 HSV, VZV		26 HSV

В скобках указан вирус/клеточная культура, на которых проведено указанное исследование. ^b EC₅₀ – концентрация 50%-ного ингибирования репродукции рин-5'-фосфата. ^h Препарат получил одобрение для лечения HSV/VZV в Европейском Союзе, но не одобрен FDA [59, 86]. ⁱ Препарат получил разрешение FDA на "экстренное использование" в США для лечения COVID-19 в ноябре 2020 года.³ IMPDH (inosine-5'-monophosphate dehydrogenase) – инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа. kRSV (respiratory-syncitial virus) – респираторно-синцитиальный вирус. ¹Препарат получил одобрение для лечения вирусов гриппа ^а I С₅₀ – концентрация 50%-ного ингибирования активности ферментата в присутствии NTP; K_i – константа ингибирования, K_d – константа диссоциации. вируса на культурах клеток в присутствии нуклеозидного аналога. ^сДефицитный по тимидинкиназе штамм HSV-1 (B2006, мугантный ген тимидинкиназы). ^d LD₅₀ – доза, вызывающая гибель 50% популяции дабораторных животных. ^e 5'-трифосфатная форма. ^f 5'-дифосфатная форма. ^g Merиловый эфир рибави-А, В, С в Японии в 2014 году, одобрен в Российской Федерации и Китає, но не одобрен FDA. ^тТимидинкиназа вируса герпеса В обезьян (BV).

Таблица 2. Окончание

Токсичность и

Статус препарата

побочные эффекты

 EC_{50}^{b}

Молекулярная мишень IC₅₀ (K_i или K_d)^a

Лекарственный препарат

Вирус

Ž

VI. Ингибиторы синтеза вирусной ДНК, механизм полностью не изучен

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

трифосфат ингибирует обратную транскрипцию, осуществляемую HBV-полимеразой, тремя путями: (1) препятствует образованию ковалентного комплекса HBV-полимеразы с растущей (–)цепью вирусной ДНК (ингибирование прайминговой активности HBV-полимеразы); (2) кинетически терминирует синтез (-)цепи вирусной ДНК, встраиваясь в нее вместо dGTP; (3) кинетически терминирует синтеза (+)цепи вирусной ДНК на матрице (-)цепи, встраиваясь вместо dGTP. Данные молекулярного моделирования и изучения ферментативной активности позволяют предположить, что уникальное свойство энтекавира ингибировать сразу три вида активности HBV-полимеразы связано с оптимальным соответствием пространственному расположению боковых групп аминокислотных остатков в хвостовой части сайта связывания NTP при сохранении всех ключевых взаимодействий, характерных для природного субстрата dGTP [61, 62]. Энтекавир-5'-трифосфат ингибирует ДНК-полимеразу HBV (K_i 0.0012 мМ), будучи слабым ингибитором клеточных ДНК-полимераз α , β , δ (K_i 18–40 мМ) и митохондриальной ДНК-полимеразы (*K*_i > 160 мМ) [63], а телбивудин-5'-трифосфат практически не ингибирует полимеразы клеток человека [64]. В отличие от других ингибиторов HBV-полимеразы (ламивудин, адефовир дипивоксил), энтекавир содержит 3'-ОН группу, что не предотвращает включения еще нескольких нуклеотидов в синтезируемую полимеразой цепь вирусной ДНК (кинетическая терминация).

Софосбувир представляет собой ингибитор РНК-зависимой РНК-полимеразы (NS5B) вируса гепатита С (HCV). Софосбувир подвергается быстрому внутриклеточному метаболизму в печени с образованием активного аналога UTP, который связывается с активным сайтом NS5B и далее действует по механизму обрыва цепи, синтезируемой вирусной РНК [65–69]. Аминокислотная последовательность активного сайта РНК-полимеразы NS5B высококонсервативна, что обеспечивает высокую селективность и низкую токсичность действия софосбувира по результатам доклинических и клинических исследований [67].

Помимо ингибитора HBV-полимеразы энтекавира, к кинетическим терминаторам синтеза вирусных нуклеиновых кислот в ряду аналогов нуклеозидов относится ингибитор HSV-полимеразы бривудин, а также активный в отношении ряда PHK-вирусов: Эбола, коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), коронавирусов тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2) – лекарственный препарат ремдесивир (табл. 2) [70–74].

Еще один лекарственный препарат — рибавирин (табл. 2) — ингибирует отдельные стадии биосинтеза нуклеотидов *de novo*, что снижает скорость репликации вирусов в клетке. Исторически считалось, что основной механизм действия рибавирина против ряда РНК-вирусов (HCV, респираторно-синцитиального вируса) заключается в ингибировании инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы и связанном с ним снижении уровня GTP [75], необходимого для трансляции, транскрипции и репликации генома РНК-вируса. Однако важными альтернативными механизмами противовирусной активности рибавирин-5'-трифосфата может быть конкурентное ингибирование РНК-полимеразы, а также летальный мутагенез [76], при котором не происходит мгновенного ингибирования, а генерируются вирусные геномы, содержащие ошибочные нуклеотиды. Рибавирин-5'трифосфат включается в РНК вместо АТР и GTP и образует комплементарные пары с уридином и цитидином, что резко увеличивает частоту мутаций, приводящих к появлению нежизнеспособных популяций РНК-вирусов [77–79].

Лекарственный препарат фавипиравир (табл. 2). первоначально одобренный в Японии в 2014 году для лечения гриппа, оказался эффективным средством против SARS-CoV-2 [80]. Существует несколько мнений о механизме действия этого соединения. Некоторые исследователи полагают, что человеческая гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза играет ключевую роль в процессе активации фавипиравира как аналога азотистого основания, превращая фавипиравир в 5'-фосфорибозилированный метаболит, который фосфорилируется киназами до активного 5'-трифосфата и затем ингибирует РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса, конкурируя с ее нативными субстратами GTP и ATP [81, 82]. В других исследованиях показано, что фавипиравир может действовать и по механизму летального мутагенеза [83, 84]. Фавипиравир, как и рибавирин, несет карбоксамидную группу, присоединенную к остатку триазола и свободно вращающуюся вокруг С–С связи, поэтому он может имитировать как гуанин, так и аденин. Соответственно, концепция летального мутагенеза вируса, впервые описанная для рибавирина [79], может быть справедлива и для фавипиравира.

Таким образом, аналоги нуклеозидов представляют собой класс противовирусных агентов с широким спектром биологической активности. Уже доказана их эффективность в отношении ряда РНК-вирусов, включая ретровирус ВИЧ, пикорно-, тога-, рабдо-, покс- и герпесвирусы.

Пролекарственные формы 5'-нуклеозидфосфатов

Специфичность киназ, катализирующих последовательные стадии 5'-фосфорилирования нуклеозидов в клетке, ограничивает возможности применения нуклеозидов для лечения инфекционных заболеваний. Применение в качестве медицинских



Рис. 4. Фосфонатные пролекарственные формы аналогов нуклеотидов. (*S*)-НРМРА – (*S*)-9-(3-гидрокси-2-фосфонилметоксипропил)аденин.

препаратов 5'-фосфорилированных форм модифицированных нуклеозидов позволяет избежать первой скоростьлимитирующей стадии фосфорилирования нуклеозидов и повысить эффективность их действия на зараженные вирусом клетки [102, 103]. Подобная стратегия имеет ряд недостатков, так как введение полярной фосфатной группы в состав модифицированных нуклеозидов существенно затрудняет проникновение таких соединений в клетку, а внутри они подвергаются действию хозяйских фосфатаз. В связи с этим применение вместо 5'-фосфатных форм нуклеозидов 5'-фосфонатных производных, не подверженных дефосфорилированию, повышает устойчивость целевого соединения и улучшает его проникновение через клеточную мембрану. На основе фосфонатных производных нуклеозидов и их ациклических аналогов разработан ряд лекарственных средств, способных превращаться в трифосфорилированные формы и подавлять репликацию вирусов в клетке (рис. 4, табл. 2) [102, 104].

Фосфазид – нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (НИОТ), применяемый в антиретровирусной терапии ВИЧ [104]. Отечественный препарат на его основе Никавир® (Nikavir) зарекомендовал себя как эффективный нетоксичный препарат для проведения антиретровирусной терапии. Ациклические аналоги фосфазида, препараты адефовир и тенофовир, применяемые в антиретровирусной терапии, подавляют репродукцию ВИЧ и HBV [102]. Для тенофовира дизопроксил фумарата, выпущенного на рынок в 2001 году, продемонстрирована повышенная эффективность по сравнению с тенофовиром, что связано с наличием двух биодеградируемых гидрофобных остатков, улучшающих проникновение этого соединения в клетку. Цидофовир (S-HPMPC) представляет собой производное цитидина, модифицированное по рибофуранозному фрагменту с сохранением 2'- и 5'-гидроксильных групп, активное против большинства ДНК-вирусов, в том числе полиомавирусов, папилломавирусов, ортопоксвирусов, HCV, VZV, вируса Эпштейна–Барр, аденовирусов и CMV [102].

Альтернативой фосфонатному методу считается ПРОТИД-технология (ПРОлекарство + нуклеоТИД), которая была предложена в начале 90-х годов XX века [105, 106]. В основе этого подхода лежит химическая модификация нуклеозид-5'-фосфатов путем введения двух липофильных биодеградируемых остатков в состав фосфатной группы (рис. 5). Полученные производные легко проникают через клеточную мембрану, эффективно накапливаются в клетке, постепенно метаболизируются до биологически активных нуклеозид-5'-фосфатов. К преимуществам ПРОТИДтехнологии по сравнению с фосфонатным методом относится снижение токсичности модифицированных нуклеозидов. Первые эксперименты по применению ПРОТИД-технологии в антивирусной терапии связаны с применением арилфосфатных и фосфорамидатных производных зидовудина [106]. На Т-лимфоцитах (линия клеток ЈМ) было показано, что 5'-диарилфосфат зидовудина в концентрации порядка 10 мкМ подавлял репликацию ВИЧ-1, в то время как исходный зидовудин был практически не активен на этой линии клеток. Замена одной арильной группы на остаток аланина приводила к существенному увеличению ингибиторной активности 5'-аланил(арил)фосфорамидата зидовудина (ЕС₅₀ 0.8 мкМ) по сравнению 5'-диарилфосфатом (ЕС₅₀ 10 мкМ). Введение аминокислотных остатков, содержащих гидрофобную боковую цепь, представляется перспективным ввиду повышенной способности проникать в клетку и возможности гидролитического расщепления ферментами внутри клетки.

Модифицированное фосфонатное нуклеозидное пролекарство тенофовира алафенамид обладает более высокой активностью в отношении ВИЧ и HCV и лучше распределяется в тканях по сравнению с тенофовиром. В ряду пуриновых и пиримидиновых 2'С-метилнуклеозидов синтези-

рованы такие производные, как 7-деаза-2'С-метиладенозин, 2'-метил-2'-фторцитидин, 2'-метил-2'фторуридин, которые подавляют репликацию ряда РНК- и ДНК-вирусов [103]. Модификации 5'-фосфатного звена приводят к повышению противовирусной активности 2'С-метилнуклеозидов в клетке. Соединение IDX-184, содержащее S-пивалоил-2-тиоэтильный фрагмент и N-бензилфосфамидную группу, оказалось мощным ингибитором репликации HCV (EC₅₀ 0.03-0.2 мкМ). Аналог IDX184 -INX189 — проявлял высокую противовирусную активность в отношении HCV (EC₅₀ 0.01 мкМ). Наличие модифицированного фосфатного остатка способствует большей эффективности INX189 за счет создания более высокой концентрации NTP в клетках по сравнению с исходным 2'С-метилгуанозином (внутриклеточная концентрация NTP из INX189 в 4 раза больше концентрации NTP из 2'С-метилгуанозина через 24 ч после обработки культуры клеток). Применение другого производного 2'С-метилгуанозина, BMS-986094 (INX-189 в комбинации с рибавирином), давало значительный синергетический эффект в ингибировании репликации вируса Денге in vitro (EC₉₀ 0.11 мкМ для INX-189, ЕС₉₀ 100 мкМ для рибавирина, при комбинации двух препаратов: ЕС₉₀ 0.022 мкМ для INX-189 и ЕС₉₀ 10 мкМ для рибавирина) [107].

В ходе исследования зависимости "структура-активность" на модифицированных производных пиримидиновых нуклеозидов было показано, что ПРОТИД-производное 2'-метил-2'фторуридина (рис. 5) эффективно ингибировало репликацию HSV, в то время как исходный нуклеозид, 2'-метил-2'-фторуридин, проявлял очень слабую противовирусную активность. Sp-изомер (расположение заместителей при атоме фосфора соответствует S-конфигурации) этого ПРОТИДпроизводного (лекарственный препарат софосбувир) намного активнее (EC₉₀ 0.42 мкМ) *R*p-изомера (расположение заместителей при атоме фосфора соответствует *R*-конфигурации, ЕС₉₀ 7.5 мкМ) и используется для лечения гепатита С в комбинации с другими лекарственными препаратами (рис. 5).

Ремдесивир, аналог аденозин-5'-монофосфата, считается перспективным пролекарством, способным ингибировать РНК-зависимую РНКполимеразу коронавирусов. Этот препарат изначально разрабатывали для терапии лихорадки Эбола и лихорадки Марбург и обнаружили его противовирусную активность в отношении SARS-CoV (EC_{50} 0.069 мкМ) и MERS-CoV (EC_{50} 0.074 мкМ). Ремдесивир метаболизируется в трифосфатную форму намного быстрее, чем его аналог 1'-циано-4-аза-7,9-дидеазааденозин, обладающий значительно более низким показателем противовирусной активности в отношении вирусов SARS-CoV и MERS-CoV. Согласно недавним исследованиям, ремдесивир эффективно ингибирует SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6 (EC₅₀ 0.77 мкМ), при этом обладает низкой цитотоксичностью (концентрация 50%-ной гибели клеток CC₅₀ > > 100 мкМ) и высоким индексом селективности (SI > 129.87) [80].

При модификации структуры ремдесивира путем введения 2'С-метильной группы и 3'О-изобутироильной группы получен новый пролекарственный нуклеозидный аналог (GS-6620, *S*p-изомер), который эффективно накапливается в гепатоцитах и подавляет репродукцию репликонов HCV в низкой концентрации (EC₅₀ в диапазоне 68–427 нМ) [108, 109].

В клетке фосфамидный остаток ПРОТИД-лекарства подвергается ферментативному расщеплению в присутствии эстеразы (CES1) и катепсина A (CTSA) с образованием соответствующих нуклеозид-5'-монофосфатов. Именно поэтому ПРОТИД-лекарства эффективны для борьбы с вирусами, инфицирующими клетки с экспрессией CES1 и CTSA (например, HCV в гепатоцитах) [110].

В некоторых случаях стадия монофосфорилирования не лимитирует общую скорость реакции трифосфорилирования, что может быть связано со структурными особенностями производного нуклеозида. Например, для азидотимидина скоростьлимитирующая стадия – образование 5'-дифосфатной формы под действием тимидилаткиназы. Нуклеозиддифосфаткиназа работает с низкой эффективностью на неоптимальных для нее субстратах: уридин-5'-дифосфате и 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксиуридин-5'-дифосфате [111].

В связи с вышеперечисленными факторами разработка пролекарственных три- и дифосфатных форм нуклеозидов считается более универсальным подходом, позволяющим обойти потенциальные скорость-лимитирующие стадии и побочные метаболические процессы, протекающие в основном на уровне нуклеозидов и их 5'-монофосфатов (например, дезаминирование), и в конечном счете эффективно доставлять биологически активные NDP и NTP в клетку. Ввиду низкой устойчивости и высокой полярности NDP и NTP основные сложности при разработке таких лекарственных форм связаны с низкой устойчивостью пирофосфатной связи и доставкой таких соединений в клетку.

Новый синтетический подход, разработанный в лаборатории проф. Криса Мейера (Chris Meier), предполагает: 1) использование частично заряженных форм NDP и NTP, обладающих устойчивостью к гидролизу; 2) введение биодеградируемых липофильных остатков по концевой фосфатной группе. Таким способом уже получен ряд биологически активных транспортных форм AZT и ставудина (рис. 6) и изучена их противовирус-



Рис. 5. Пролекарственные формы аналогов нуклеозидфосфатов, полученные с применением ПРОТИД-технологии. AZT – азидотимидин.


Рис. 6. Гидролиз дифосфатных и трифосфатных пролекарственных форм AZT (*a*) и ставудина d4T (*б*) (составлено по данным работы [111]).

ная активность [111]. Химический гидролиз пролекарственной формы AZT в виде δ -циклосалигенилдифосфата (рис. 6*a*) приводит к образованию смеси 5'-моно- и 5'-дифосфатной форм AZT с преобладанием в смеси монофосфатной формы. С учетом этого факта в качестве более перспективных пролекарственных форм предложено использовать бис(ацилоксибензил)нуклеозиддии -трифосфаты — DiP- и TriP-пролекарства (рис. 6*б*). Обработка DiP- и TriP-производных ставудина (II) клеточными экстрактами, сывороткой крови или карбоксиэстеразой из печени свиньи приводила к образованию преимущественно соответствующих ди- и трифосфатов; при этом несимметричные пролекарственные формы ($R_1 \neq R_2$, R_1 -Ме или Bu, $R_2 > C_4H_9$) были более устойчивы к ферментативному гидролизу пирофосфатной группы по сравнению с симметричными ($R_1 = R_2$).

В опытах на Т-лимфоцитах DiP- и TriP-производные ставудина (рис. 6б) более эффективно ингибировали ОТ-ВИЧ, чем нефосфорилированный препарат (d4T). Пролекарственные формы нуклеозидов, содержащие ацильные остатки с $R_{1,2} = C_8 H_{17}$, проявляли высокую анти-ВИЧ-активность в опытах на культуре клеток CEM, что доказывает их способность проникать через клеточные мембраны с последующим высвобождением фосфорилированных метаболитов d4T.

Таким образом, фосфатные пролекарственные формы на основе модифицированных нуклеозидов – уже хорошо зарекомендовавший себя подход к созданию новых противовирусных средств. Введение гидрофобных остатков в 5'-фосфатную группу модифицированного нуклеозида (ПРОТИДтехнология) позволяет повысить эффективность его действия как ингибитора репликации вируса. ПРОТИД-технология с применением фосфамидных производных нуклеозидов - еще один современный подход к созданию эффективных лекарственных средств для терапии вирусных и онкологических заболеваний. Именно на основе ПРОТИД-технологии получено 3 эффективных противовирусных лекарственных препарата: софосбувир для лечения гепатита С, алафенамид тенофовира для антиретровирусной терапии ВИЧ и гепатита С и ремдесивир для лечения COVID-19.

В качестве альтернативы рассмотренным пролекарственным формам исследуют нуклеозидные аналоги, содержащие остатки никотиновой кислоты [112]. Введение остатков никотиновой кислоты в углеводное звено нуклеозида позволяет снизить токсичность препарата, повысить его устойчивость в клетке, продлить время жизни в кровотоке, а также улучшить проницаемость через гематоэнцефалический барьер [113, 114].

ГИДРОФОБНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ С ПРОТИВОВИРУСНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Гидрофобные соединения ненуклеозидной природы с противовирусными свойствами

В основе механизма биологической активности ряда противовирусных лекарственных препаратов с выраженными гидрофобными свойствами лежит способность блокировать работу вирусных ферментов, связываясь с их определенным участком. В отличие от лекарств, созданных на нуклеозидной основе, мишенями которых служит нуклеозидсвязывающий активный центр полимераз, эти соединения не подвергаются химическим превращениям внутри клетки. Их мишени — гидрофобные участки вирусных ферментов.

В структуре ОТ-ВИЧ-1 есть гидрофобная область, так называемый "гидрофобный карман", которая находится на расстоянии около 15 Å от нуклеотидсвязывающего центра [115]. При попадании гидрофобного соединения в этот "карман" и формировании с ним прочной связи фермент теряет конформационную подвижность, что ведет к аллостерическому ингибированию его активности [116]. Ингибиторы гидрофобной приро-



Рис. 7. Структура доравирина.

ды, которые способны связаться в гидрофобном кармане ОТ-ВИЧ-1, - это ненуклеозидные ингибиторы (ННИОТ ВИЧ-1). Они специфичны по отношению к структуре гидрофобного кармана ОТ-ВИЧ-1 и не обладают активностью в отношении ОТ-ВИЧ-2 и других ретровирусов. В клинической практике эти ингибиторы используют в комплексной терапии ВИЧ-1-инфекции [45]. К одобренным FDA препаратам ННИОТ ВИЧ-1 первого поколения относятся: невирапин, делавиридин, эфавиренц, - к препаратам второго поколения: этравирин и рилпивирин. Класс диарилпиримидинов, препаратов второго поколения, оказался перспективным для создания ингибиторов такого рода в силу конформационной гибкости, в результате которой они могут "перестраиваться" и "адаптироваться" к различным аминокислотным заменам внутри гидрофобного кармана. В 2018 году FDA был одобрен еще один препарат этого класса – доравирин (рис. 7).

Новые варианты ингибиторов класса диарилпиримидинов активно исследуют в настоящее время в качестве потенциальных противовирусных средств [117-121]. Так, НСУ - это РНК-содержащий оболочечный вирус, который относится к семейству Flaviviridae. В структуре PHK-зависимой РНК-полимеразы этого вируса, NS5B, есть гидрофобный карман, который находится на расстоянии 30 Å от нуклеотидсвязывающего активного центра [122]. Исследовано большое число гидрофобных ароматических соединений, способных связаться с этим сайтом NS5B [123-129]. В настояшее время при лечении HCV используют препарат дасабувир – аллостерический ингибитор ферментативной активности NS5B из HCV генотипа 1а и 1b (IC₅₀ 2.8 и 10.7 нМ соответственно). Этот препарат получил одобрение FDA и включен в список жизненно важных препаратов. Другой препарат класса пиперазинкарбоксамидов – беклабувир (рис. 8); он тоже "работает" как аллостерический ингибитор РНК-полимеразы HCV. Эффективность и безопасность его применения исследована в составе комплексов: беклабувир + пегилированный интерферон + рибавирин [130] и беклабувир + асунапревир (ингибитор сериновой протеазы NS3) + даклатасвир (ингибитор белка NS5A) [131]. На основании клинической оценки эффективности, безопасности и фармакокинетических свойств этих комплексов Бюро фармацевтики и безопасности пищевых продуктов Японии (Pharmaceutical and Food Safety Bureau, PFSB) одобрило применение препарата Хітепсу. Этот препарат представляет собой второй из приведенных выше комплексов: беклабувир + асунапревир + даклатасвир – с фиксироваными дозами всех компонентов, для лечения пациентов, инфицированных HCV генотипа 1 [132].

Влияние гидрофобных заместителей на противовирусную активность производных нуклеозидов

Производные пиримидинов, такие как 2',5'бис-О-(трет-бутилдиметилсилил)-пентафуранозил-3'-спиро-5"-(4"-амино-1",2"-оксатиол-2",2"-диоксид)пиримидин (TSAO), способны связываться с ОТ-ВИЧ-1 *in vitro* и ингибировать активность фермента по аллостерическому механизму [133–136]. Однако при сравнении эффективности ингибирования ОТ-ВИЧ этими производными нуклеозидов с эффективностью ННИОТ-ВИЧ эти производные пиримидинов существенно проигрывают. Их ингибиторный эффект теряется даже при минорных аминокислотных заменах в структуре ОТ-ВИЧ-1, не влияющих на ингибиторные свойства известных ННИОТ-ВИЧ [137]. Кроме того, эти аналоги нуклеозидов высокотоксичны, а попытки снизить токсичность, варьируя структуру заместителей, приводят к снижению их ингибиторной активности [138].

Исследования противовирусной активности различных производных нуклеозидов были проведены в клеточных системах в отношении большой группы флавивирусов, которые переносятся членистоногими (арбовирусов) и относятся к возбудителям социально значимых эндемических заболеваний [139-144]. Среди них вирус клещевого энцефалита, вирус Денге, вирус желтой лихорадки, вирус японского энцефалита, вирус Западного Нила. Оказалось, что наиболее высокую противовирусную активность *in vitro* проявляют нуклеозиды, содержащие трифенилметильные заместители в разных положениях пентафуранозного цикла. Механизм их действия пока нельзя считать окончательно установленным, хотя Eyer L. и соавт. [145], основываясь на данных по ингибированию вируса Денге в клеточных системах, высказали предположение, что такие производные нуклеозидов ингибируют процесс репликации вирусной РНК, взаимодействуя с активным центром РНК-зависимой РНК-полимеразы.

В тех случаях, когда объемные гидрофобные заместители находятся в аналоге нуклеозида при



Рис. 8. Структура беклабувира.

агликоне, противовирусное действие определяется амфипатическим характером этих соединений. Они ингибируют начальную стадию слияния наружной мембраны оболочечных вирусов с оболочками инфицируемых клеток. Противовирусная эффективность таких производных нуклеозидов продемонстрирована на примере HSV-1 и HSV-2 (IC₅₀ 48 нM) [146], а также вируса клещевого энцефалита (IC₅₀ 18–24 нM) [147]. В концентрациях, достаточных для создания противовирусного эффекта, такие нуклеозиды не оказывают ни цитотоксического, ни цитостатического эффекта на клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре рассмотрены структурно-функциональные характеристики известных аналогов нуклеозидов, которые обусловливают их противовирусные или противопаразитарные свойства. Знание особенностей клеточного метаболизма природных нуклеозидов необходимо, чтобы идентифицировать те стадии обменных процессов, которые могут быть чувствительны к лекарственным препаратам, созданным на основе нуклеозидов. Мишенями для противопаразитарных средств могут быть нуклеозидфосфорилазы – в тех случаях, когда эти ферменты у человека и паразита имеют заметные отличия. Противовирусное действие аналогов нуклеозидов в основном связано с их способностью подвергаться ферментативному фосфорилированию внутри клетки с образованием модифицированных нуклеозид-5'-моно-, дии трифосфатов. Эти метаболиты затем конкурируют с природными NTP за связывание с активным центром вирусных полимераз и либо остаются только конкурентными ингибиторами, либо становятся терминаторами роста цепи вирусной ДНК/РНК или триггерами мутагенеза вирусного генома. Аналоги нуклеозидов, несущие гидрофобные заместители, могут быть как ингибиторами вирусных ферментов, участвующих в репликации нуклеиновых кислот вируса, так и ингибиторами процесса проникновения вируса в клетку, а также могут действовать на клеточные ферменты, косвенно задействованные в репликации вирусов (рибавирин). Конкретный механизм противовирусного действия зависит от структуры и положения заместителя в нуклеозиде.

Специфическое ингибирование вирусных ферментов соединениями нуклеозидной и ненуклеозидной природы, содержащими гидрофобное звено, может происходить и по аллостерическому механизму, если в структуре фермента присутствуют гидрофобные участки на относительно небольшом расстоянии от активного центра. К ферментам, обладающим такой структурой, принадлежат ОТ-ВИЧ-1 и РНК-зависимая РНК-полимераза ряда вирусов, что позволяет считать их перспективными мишенями при поиске новых противовирусных средств.

Практически все лекарственные препараты помимо желаемого действия вызывают и побочные эффекты, связанные с токсическим действием препарата на здоровые клетки, на системы инактивации и выведения лекарственного препарата печенью и почками. Лекарства на основе нуклеозидов могут оказывать токсический эффект из-за ингибирования ферментов, метаболизирующих природные нуклеозиды. Еще одна серьезная проблема, ограничивающая применение нуклеозидных препаратов, - развитие у инфекционного агента лекарственной резистентности. Это, как правило, следствие длительного применения препарата при лечении латентных и хронических инфекций. Резистентность возникает при накоплении в геноме патогена мутаций, приводящих к образованию лекарственноустойчивых штаммов [148]. Для повышения эффективности и снижения дозировки препарата важна избирательность его действия на целевые мишени в организме.

В настоящее время при создании препаратов на основе нуклеозидов придерживаются стратегии, которая позволяет снизить их токсичность для человека и повысить эффективность действия на инфицированные клетки. И эта стратегия базируется на использовании пролекарственных форм модифицированных нуклеозидов. Комбинирование гидрофобных остатков при 5'-фосфатной группе модифицированного нуклеозида (ПРОТИДтехнология) позволяет усилить его действие на зараженные вирусом клетки. ПРОТИД-технология с применением фосфорамидатных производных нуклеозидов — это высокоэффективный подход к созданию новых лекарств для терапии вирусных заболеваний. С помощью этой технологии получено три эффективных противовирусных препарата: софосбувир для лечения гепатита С,

алафенамид тенофовира для антиретровирусной терапии ВИЧ-инфекции и гепатита С и ремдесивир для лечения COVID-19. В настоящее время разрабатываются подходы, связанные с применением ди- и трифосфатных форм нуклеозидных пролекарств, способных оказывать селективное действие за счет их накопления в клетке.

Авторы выражают благодарность к.х.н. Зенченко В.О. за помощь в подготовке графических материалов, к.х.н. Ословскому В.Е. и к.х.н. Осолодкину Д.И. за ценные замечания и рекомендации при подготовке обзора.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 18-29-09037 и № 20-34-70116.

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. De Clercq E., Field H.J. (2006) Antiviral prodrugs the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *Br. J. Pharmacol.* **147**(1), 1–11.
- 2. De Clercq E., Neyts J. (2009) Antiviral agents acting as DNA or RNA chain terminators. In: *Antiviral Strategies*. Eds Krausslich H.G., Bartenschlager R. Berlin, Heidelberg: Springer, 53–84.
- Jordheim L.P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C. (2013) Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12(6), 447–464.
- 4. Jordan P.C., Stevens S.K., Deval J. (2018) Nucleosides for the treatment of respiratory RNA virus infections. *Antiviral. Chem. Chemother.* **26**, 2040206618764483.
- 5. De Clercq E. (2019) New nucleoside analogues for the treatment of hemorrhagic fever virus infections. *Chem. Asian J.* **14**(22), 3962–3968.
- Postigo M.P., Guido R.V., Oliva G., Castilho M.S., da R. Pitta I., de Albuquerque J.F., Andricopulo A.D. (2010) Discovery of new inhibitors of *Schistosoma mansoni* PNP by pharmacophore-based virtual screening. J. Chem. Inf. Model. 50(9), 1693–1705.
- Tavares N.C., de Aguiar P.H.N., Gava S.G., Oliveira G., Mourão M.M. (2016) Schistosomiasis: setting routes for drug discovery. In: *Special Topics in Drug Discovery*. Eds Chen T., Chai S.C. London: InTechOpen, 105–132.
- 8. El Kouni M.H. (2017). Pyrimidine metabolism in schistosomes: a comparison with other parasites and the search for potential chemotherapeutic targets. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **213**, 55–80.
- Evans G.B., Tyler P.C., Schramm V.L. (2018) Immucillins in infectious diseases. ACS Inf. Dis. 4(2), 107–117.

- Drenichev M.S., Oslovsky V.E., Mikhailov S.N. (2016) Cytokinin nucleosides – natural compounds with a unique spectrum of biological activities. *Curr. Top. Med. Chem.* 16(23), 2562–2576.
- Oslovsky V.E., Drenichev M.S., Sun L., Kurochkin N.N., Kunetsky V.E., Mirabelli C., Neyts J., Leyssen P., Mikhailov S.N. (2017) Fluorination of naturally occurring N⁶-benzyladenosine remarkably increased its antiviral activity and selectivity. *Molecules*. 22(7), 1219.
- 12. Traut T.W. (1994) Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Moll. Cell. Biochem.* **140**(1), 1–22.
- Jensen K.F., Dandanell G., Hove-Jensen B., WillemoËs M. (2008) Nucleotides, nucleosides, and nucleobases. *EcoSal Plus.* 3(1), 1–39.
- Mathews C.K., van Holde K.E. (1996) *Biochemistry*, 2nd ed. California: Benjamin Cummings Publishing Co., 784–817.
- Lewkowicz E.S., Iribarren A.M. (2006) Nucleoside phosphorylases. *Curr. Org. Chem.* 10(11), 1197–1215.
- Alexeev C.S., Kulikova I.V., Gavryushov S., Tararov V.I., Mikhailov S.N. (2018) Quantitative prediction of yield in transglycosylation reaction catalyzed by nucleoside phosphorylases. *Adv. Synth. Catal.* 360(16), 3090–3096.
- 17. Valentin-Hansen P. (1978) Uridine-cytidine kinase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **51**, 308–314.
- Moran L.A., Horton H.R., Scrimgeour K.G., Perry M.D. (2012) *Principles of Biochemistry*, 5th ed. Ed. Jaworski A. London: Pearson Education.
- Brown A.M., Hoopes S.L., White R.H., Sarisky C.A. (2011) Purine biosynthesis in archaea: variations on a theme. *Biol. Direct.* 6, 63.
- Thia-Toong T.L., Roovers M., Durbecq V., Gigot D., Glansdorff N., Charlier D. (2002) Genes of *de novo* pyrimidine biosynthesis from the hyperthermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*: novel organization in a bipolar operon. *J. Bacteriol.* 184(16), 4430–4441.
- He B., Zalkin H. (1992) Repression of *Escherichia coli* purB is by a transcriptional roadblock mechanism. *J. Bacteriol.* 174(22), 7121–7127.
- Hayes W. (1964) The Genetics of Bacteria and Their Viruses. Studies in Basic Genetics and Molecular Biology, 2nd ed. New York: John Wiley and Sons.
- 23. Hyde J.E. (2007) Targeting purine and pyrimidine metabolism in human apicomplexan parasites. *Curr. Drug Targets.* **8**(1), 31–47.
- Hazleton K.Z., Ho M.C., Cassera M.B., Clinch K., Crump D.R., Rosario I., Jr., Schramm V.L. (2012) Acyclic immucillin phosphonates: second-generation inhibitors of *Plasmodium falciparum* hypoxanthineguanine-xanthine phosphoribosyltransferase. *Chem. Biol.* 19(6), 721–730.
- Senft A.W., Crabtree G.W. (1983) Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy. *Pharmacol. Ther.* 20(3), 341–356.
- Lago E.M., Xavier R.P., Teixeira T.R., Silva L.M., da Silva Filho A.A., de Moraes J. (2018) Antischistosomal agents: state of art and perspectives. *Future Med. Chem.* 10(1), 89–120.

- Lindmark D.G., Jarroll E.L. (1982) Pyrimidine metabolism in *Giardia lamblia* trophozoites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 5(5), 291–296.
- Aldritt S.M., Tien P., Wang C.C. (1985) Pyrimidine salvage in *Giardia lamblia*. J. Exp. Med. 161(3), 437–445.
- 29. Vitti G.F., O'Sullivan W.J., Gero A.M. (1987) The biosynthesis of uridine 5'-monophosphate in *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* **17**(3), 805–812.
- Kicska G.A., Tyler P.C., Evans G.B., Furneaux R.H., Kim K., Schramm V.L. (2002) Transition state analogue inhibitors of purine nucleoside phosphorylase from *Plasmodium falciparum*. J. Biol. Chem. 277(5), 3219–3225.
- Shi W., Ting L.M., Kicska G.A., Lewandowicz A., Tyler P.C., Evans G.B., Schramm V.L. (2004) *Plasmodium falciparum* purine nucleoside phosphorylase: crystal structures, immucillin inhibitors, and dual catalytic function. *J. Biol. Chem.* 279(18), 18103–18106.
- 32. Schramm V.L. (2018) Enzymatic transition states and drug design. Chem. Rev. **118**(22), 11194–11258.
- 33. Cassera M.B., Hazleton K.Z., Merino E.F., Obaldia III N., Ho M.C., Murkin A.S., DePinto R., Gutierrez J.A., Almo S.C., Evans G.B., Babu Y.S., Schramm V.L. (2011) *Plasmodium falciparum* parasites are killed by a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase in a primate animal model. *PLoS One.* 6(11), e26916.
- Suarez J., Haapalainen A.M., Cahill S.M., Ho M.C., Yan F., Almo S.C., Schramm V.L. (2013) Catalytic site conformations in human PNP by ¹⁹F-NMR and crystallography. *Chem. Biol.* 20(2), 212–222.
- Куханова М.К., Коровина А.Н., Кочетков С.Н. (2014) Вирус простого герпеса человека: жизненный цикл и поиск ингибиторов. *Успехи биол. химии.* 54, 457–494.
- Айвазашвили В.А., Михайлов С.Н., Падюкова Н.Ш., Карпейский М.Я., Бибилашвили Р.Ш. (1986) 1-(3'-С-метил-β-*D*-рибофуранозил)урацил-5'-трифосфат – терминатор синтеза РНК, катализируемого РНК-полимеразой *E. coli. Биоорган. химия.* 12(5), 708–710.
- Tunitskaya V.L., Rusakova E.E., Padyukova N.S., Ermolinsky B.S., Chernyi A.A., Kochetkov S.N., Mikhailov S.N. (1997) Substrate properties of C'-methyl UTP derivatives in T7 RNA polymerase reactions. Evidence for N-type NTP conformation. *FEBS Lett.* 400(3), 263–266.
- Айвазашвили В.А., Михайлов С.Н., Падюкова Н.Ш., Бибилашвили Р.Ш., Карпейский М.Я. (1987)
 5'-С-метилнуклеозидтрифосфаты в реакции синтеза РНК, катализируемой РНК-полимеразой Escherichia coli. Молекуляр. биология. 21(4), 1080–1091.
- 39. Савочкина Л.П., Свиряева Т.В., Бейгельман Л.Н., Падюкова Н.Ш., Кузнецов Д.А., Лысов Ю.П., Михайлов С.Н., Бибилашвили Р.Ш. (1989) Субстратные свойства С-метилнуклеозидтрифосфатов в реакции синтеза РНК, катализируемой РНК-полимеразой *Escherichia coli. Молекуляр. биология.* 23(6), 1700–1710).
- 40. Chen P., Shakhnovich E.I. (2009) Lethal mutagenesis in viruses and bacteria. *Genetics*. **183**(2), 639–650.

- Elion G.B., Furman P.A., Fyfe J.A., De Miranda P., Beauchamp L., Schaeffer H.J. (1977) Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(12), 5716– 5720.
- 42. Hodge R.V. (1993) Famciclovir and penciclovir. The mode of action of famciclovir including its conversion to penciclovir. *Antiviral Chem. Chemother.* **4**(2), 67–84.
- 43. Aoki F.Y. (2015) Antivirals against herpes viruses. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th ed. Eds Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J. Philadelphia: Elsevier, 546–562.
- Matthews T., Boehme R. (1988) Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev. Infect. Dis.* 10(Suppl. 3), S490–S494.
- 45. De Clercq E., Li G. (2016) Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**(3), 695–747.
- 46. North T.W., Cohen S.S. (1979) Aranucleosides and aranucleotides in viral chemotherapy. *Pharmacol. Ther.* **4**(1), 81–108.
- 47. De Clercq E. (1997) In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**(4), 674–693.
- Descamps J., De Clercq E. (1981) Specific phosphorylation of *E*-5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine by herpes simplex virus-infected cells. *J. Biol. Chem.* 256(12), 5973–5976.
- Allaudeen H.S., Kozarich J.W., Bertino J.R., De Clercq E. (1981) On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (*E*)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(5), 2698–2702.
- 50. De Clercq E. (2004) Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster. *Biochem. Pharmacol.* **68**(12), 2301–2315.
- 51. De Clercq E. (2011) The clinical potential of the acyclic (and cyclic) nucleoside phosphonates. The magic of the phosphonate bond. *Biochem. Pharmacol.* **82**(2), 99–109.
- 52. De Clercq E. (2007) Acyclic nucleoside phosphonates: past, present and future. Bridging chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, adeno-, herpes-, and poxvirus infections: the phosphonate bridge. *Biochem. Pharmacol.* **73**(7), 911–922.
- 53. De Clercq E., Holý A. (2005) Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**(11), 928–940.
- Balzarini J., Hao Z., Herdewijn P., Johns D.G., De Clercq E. (1991) Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 88(4), 1499–1503.
- 55. Balzarini J., Holy A., Jindrich J., Dvorakova H., Hao Z., Snoeck R., De Clercq E. (1991) 9-[(2RS)-3-fluoro-2phosphonylmethoxypropyl] derivatives of purines: a class of highly selective antiretroviral agents *in vitro* and *in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(11), 4961–4965.
- 56. De Clercq E. (1991) Broad-spectrum anti-DNA virus and anti-retrovirus activity of phosphonylmethoxyal-

kylpurines and -pyrimidines. *Biochem. Pharmacol.* **42**(5), 963–972.

- 57. Cherrington J.M., Allen S.J.W., Bischofberger N., Chen M.S. (1995) Kinetic interaction of the diphosphates of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine and other anti-HIV active purine congeners with HIV reverse transcriptase and human DNA polymerases α , β and γ . *Antiviral Chem. Chemother.* **6**(4), 217–221.
- Kramata P., Votruba I., Otová B., Holý A. (1996) Different inhibitory potencies of acyclic phosphonomethoxyalkyl nucleotide analogs toward DNA polymerases alpha, delta and epsilon. *Mol. Pharmacol.* 49(6), 1005–1011.
- Beigel J.H. (2012) Antiviral therapy (Non-HIV). In: Goldman's Cecil Medicine, 24th ed. Eds Goldman L., Schafer A.I. Philadelphia: Elsevier.
- 60. Beck J., Vogel M., Nassal M. (2002) dNTP versus NTP discrimination by phenylalanine 451 in duck hepatitis B virus P protein indicates a common structure of the dNTP-binding pocket with other reverse transcriptases. *Nucleic Acids Res.* **30**(7), 1679–1687.
- Langley D.R., Walsh A.W., Baldick C.J., Eggers B.J., Rose R.E., Levine S.M., Kapur A.J., Colonno R.J., Tenney D.J. (2007) Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J. Virol.* 81(8), 3992–4001.
- 62. Seifer M., Hamatake R.K., Colonno R.J., Standring D.N. (1998) *In vitro* inhibition of hepadnavirus polymerases by the triphosphates of BMS-200475 and lobucavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(12), 3200–3208.
- 63. Scott L.J., Keating G.M. (2009) Entecavir. Drugs. 69(8), 1003–1033.
- 64. Ruiz-Sancho A., Sheldon J., Soriano V. (2007) Telbivudine: a new option for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin. Biol. Ther.* **7**(5), 751–761.
- 65. Denning J., Cornpropst M., Flach S.D., Berrey M.M., Symonds W.T. (2013) Pharmacokinetics, safety, and tolerability of GS-9851, a nucleotide analog polymerase inhibitor for hepatitis C virus, following single ascending doses in healthy subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(3), 1201–1208.
- Murakami E., Tolstykh T., Bao H., Niu C., Steuer H.M.M., Bao D., Chang W., Espiritu C., Bansal S., Lam A.M., Otto M.J., Sofia M.J., Furman P.A. (2010) Mechanism of activation of PSI-7851 and its diastereoisomer PSI-7977. *J. Biol. Chem.* 285(45), 34337–34347.
- 67. Asselah T. (2014) Sofosbuvir for the treatment of hepatitis C virus. *Expert Opin. Pharmacother.* **15**(1), 121–130.
- Fung A., Jin Z., Dyatkina N., Wang G., Beigelman L., Deval J. (2014) Efficiency of incorporation and chain termination determines the inhibition potency of 2'-modified nucleotide analogs against hepatitis C virus polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(7), 3636–3645.
- Koch U., Narjes F. (2007) Recent progress in the development of inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Curr. Top. Med. Chem.* 7(13), 1302–1329.
- 70. Sheahan T.P., Sims A.C., Graham R.L., Menachery V.D., Gralinski L.E., Case J.B., Leist S.R., Pyrc K.,

Feng J.Y., Trantcheva I., Bannister R., Park Y., Babusis D., Clarke M.O., Mackman R.L., Spahn J.E., Palmiotti C.A., Siegel D., Ray A.S., Cihlar T., Jordan R., Denison M.R., Baric R.S. (2017) Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci. Transl. Med.* **9**(396), eaal3653.

- Gordon C.J., Tchesnokov E.P., Woolner E., Perry J.K., Feng J.Y., Porter D.P., Götte M. (2020) Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency. *J. Biol. Chem.* 295(20), 6785–6797.
- Eastman R.T., Roth J.S., Brimacombe K.R., Simeonov A., Shen M., Patnaik S., Hall M.D. (2020) Remdesivir: a review of its discovery and development leading to emergency use authorization for treatment of COVID-19. ACS Cent. Sci. 6(5), 672–683.
- 73. Ferner R.E., Aronson J.K. (2020) Remdesivir in covid-19. *Br. Med. J.* **369**, m1610.
- 74. Gordon C.J., Tchesnokov E.P., Feng J.Y., Porter D.P., Götte M. (2020) The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J. Biol. Chem.* 295(15), 4773–4779.
- Muller W.E., Maidhof A., Taschner H., Zahn R.K. (1977) Virazole (1-β-D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide); a cytostatic agent. *Biochem. Pharmacol.* 26(11), 1071–1075.
- 76. Parker W.B. (2005) Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res.* **107**(2), 165–171.
- Graci J.D., Too K., Smidansky E.D., Edathil J.P., Barr E.W., Harki D.A., Galarraga J.E., Bollinger J.M., Jr., Peterson B.R., Loakes D., Brown D.M., Cameron C.E. (2008) Lethal mutagenesis of picornaviruses with N-6-modified purine nucleoside analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(3), 971–979.
- Crotty S., Cameron C., Andino R. (2002) Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J. Mol. Med.* 80(2), 86–95.
- Crotty S., Maag D., Arnold J.J., Zhong W., Lau J.Y.N, Hong Z., Andino R., Cameron C.E. (2000) The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* 6(12), 1375–1379.
- Wang M., Cao R., Zhang L., Yang X., Liu J., Xu M., Shi Z., Hu Z., Zhong W., Xiao G. (2020) Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro. Cell Res.* 30(3), 269–271.
- Naesens L., Guddat L.W., Keough D.T., van Kuilenburg A.B.P., Meijer J., Voorde J.V., Balzarini J. (2013) Role of human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in activation of the antiviral agent T-705 (favipiravir). *Mol. Pharmacol.* 84(4), 615–629.
- 82. Jin Z., Smith L.K., Rajwanshi V.K., Kim B., Deval J. (2013) The ambiguous base-pairing and high substrate efficiency of T-705 (favipiravir) ribofuranosyl 5'-triphosphate towards influenza A virus polymerase. *PLoS One.* 8(7), e68347.
- Baranovich T., Wong S.S., Armstrong J., Marjuki H., Webby R.J., Webster R.G., Govorkova E.A. (2013) T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influ-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

enza A H1N1 viruses *in vitro*. J. Virol. **87**(7), 3741–3751.

- Smee D.F., Hurst B.L., Egawa H., Takahashi K., Kadota T., Furuta Y. (2009) Intracellular metabolism of favipiravir (T-705) in uninfected and influenza A (H5N1) virus-infected cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 64(4), 741–746.
- U.S. Food and Drug Administration (fda.gov): FDA-Арргоved Drugs, clinical trials [Электронный ресурс]. https://www. accessdata.fda.gov/ (дата обращения: 1.03.2021).
- DrugBank database. Clinical Drug Data [Электронный ресурс]. https://www.drugbank.com (дата обращения: 1.03.2021).
- 87. Approved antiviral compounds and mechanisms of drug actions of approved antiviral drugs [Электронный ресурс]. http://virusface.com (дата обращения: 1.03.2021).
- ChEMBL database of bioactive molecules with druglike properties [Электронный ресурс]. https:// www.ebi.ac.uk/chembl/(дата обращения: 25.03.2021).
- Database of privately and publicly funded clinical studies conducted around the world [Электронный pecypc]. https://clinicaltrials.gov/ (дата обращения: 1.03.2021).
- Suzuki M., Okuda T., Shiraki K. (2006) Synergistic antiviral activity of acyclovir and vidarabine against herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella-zoster virus. *Antiviral Res.* 72(2), 157–161.
- Miwa N., Kurosaki K., Yoshida Y., Kurokawa M., Saito S., Shiraki K. (2005) Comparative efficacy of acyclovir and vidarabine on the replication of varicella-zoster virus. *Antiviral Res.* 65(1), 49–55.
- Hanes J.W., Zhu Y., Parris D.S., Johnson K.A. (2007) Enzymatic therapeutic index of acyclovir. Viral versus human polymerase gamma specificity. *J. Biol. Chem.* 282(34), 25159–25167.
- 93. The DailyMed database containing labeling, submitted to the Food and Drug Administration (FDA) by companies. [Электронный ресурс]. https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/ (дата обращения: 25.03.2021).
- 94. Xiong X., Smith J.L., Kim C., Huang E.S., Chen M.S. (1996) Kinetic analysis of the interaction of cidofovir diphosphate with human cytomegalovirus DNA polymerase. *Biochem. Pharmacol.* **51**(11), 1563–1567.
- 95. Sergerie Y., Boivin G. (2008) Hydroxyurea enhances the activity of acyclovir and cidofovir against herpes simplex virus type 1 resistant strains harboring mutations in the thymidine kinase and/or the DNA polymerase genes. *Antiviral Res.* **77**(1), 77–80.
- Yoshida Y., Honma M., Kimura Y., Abe H. (2021) Structure, synthesis and inhibition mechanism of nucleoside analogues as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *Chem. Med. Chem.* 16(5), 743–766.
- 97. Куханова М.К. (2012) Анти-ВИЧ нуклеозидные препараты: история создания и взгляд в будущее. *Молекуляр. биология.* **46**(6), 860–860.
- Drabikowska A.K., Dudycz L., Shugar D. (1979) Studies on the mechanism of antiviral action of 1-(β-*D*-ribofuranosyl)-1,2,4-triazole-3-carboxamide (ribavirin). *J. Med. Chem.* 22(6), 653–657.

- 99. Ortega-Prieto A.M., Sheldon J., Grande-Pérez A., Tejero H., Gregori J., Quer J., Esteban J.I., Domingo E., Perales C. (2013) Extinction of hepatitis C virus by ribavirin in hepatoma cells involves lethal mutagenesis. *PLoS One.* 8(8), e71039.
- 100. Sheu T. G., Deyde V. M., Okomo-Adhiambo M., Garten R. J., Xu X., Bright R. A., Butler E.N., Wallis T.R., Klimov A.I., Gubareva L. V. (2008) Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(9), 3284–3292.
- 101. Focher F., Lossani A., Verri A., Spadari S., Maioli A., Gambino J.J., Wright G.E., Eberle R., Black D.H., Medveczky P., Medveczky M., Shugar D. (2007) Sensitivity of monkey B virus (*Cercopithecine herpesvirus* 1) to antiviral drugs: role of thymidine kinase in antiviral activities of substrate analogs and acyclonucleosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(6), 2028–2034.
- Seley-Radtke K.L., Yates M.K. (2018) The evolution of nucleoside analogue antivirals: a review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res.* 154, 66-86.
- 103. Yates M.K., Seley-Radtke K.L. (2019) The evolution of antiviral nucleoside analogues: a review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res.* **162**, 5–21.
- 104. Галегов Г.А. (2017) Фосфазид (никавир) высокоэффективный лекарственный препарат для лечения ВИЧ/СПИД инфекции. Вопросы вирусологии. 62(1), 5–11.
- 105. McGuigan C., Pathirana R.N., Mahmood N., Devine K.G., Hay A.J. (1992) Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT. *Antiviral Res.* 17(4), 311–321.
- 106. Cahard D., McGuigan C., Balzarini J. (2004) Aryloxy phosphoramidate triesters as pro-tides. *Mini Rev. Med. Chem.* **4**(4), 371–381.
- 107. Yeo K.L., Chen Y.L., Xu H.Y., Dong H., Wang Q.Y., Yokokawa F., Shi P.Y. (2015) Synergistic suppression of dengue virus replication using a combination of nucleoside analogs and nucleoside synthesis inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**(4), 2086–2093.
- 108. Cho A., Zhang L., Xu J., Lee R., Butler T., Metobo S., Aktoudianakis V., Lew W., Ye H., Clarke M., Doerffler E., Byun D., Wang T., Babusis D., Carey A.C., German P., Sauer D., Zhong W., Rossi S., Fenaux M., McHutchison J.G., Perry J., Feng J., Ray A.S., Kim C.U. (2014) Discovery of the first *C*-nucleoside HCV polymerase inhibitor (GS-6620) with demonstrated antiviral response in HCV infected patients. *J. Med. Chem.* 57(5), 1812–1825.
- 109. Siegel D., Hui H.C., Doerffler E., Clarke M.O., Chun K., Zhang L., Neville S., Carra E., Lew W., Ross B., Wang Q., Wolfe L., Jordan R., Soloveva V., Knox J., Perry J., Perron M., Stray K.M., Barauskas O., Feng J.Y., Xu Y., Lee G., Rheingold A L., Ray A.S., Bannister R., Strickley R., Swaminathan S., Lee W.A., Bavari S., Cihlar T., Lo M.K., Warren T.K., Mackman R.L. (2017) Discovery and synthesis of a phosphoramidate prodrug of a pyrrolo [2,1-f][triazin-4-

amino] adenine *C*-nucleoside (GS-5734) for the treatment of Ebola and emerging viruses. *J. Med. Chem.* **60**(5), 1648–1661.

- 110. Murakami E., Wang T., Babusis D., Lepist E.I., Sauer D., Park Y., Vela J.E., Shih R., Birkus G., Stefanidis D., Kim C.U., Cho A., Ray A.S. (2014) Metabolism and pharmacokinetics of the anti-hepatitis C virus nucleotide prodrug GS-6620. *Antimicrob. Agents Chemother*. 58(4), 1943–1951.
- 111. Meier C. (2017) Nucleoside diphosphate and triphosphate prodrugs an unsolvable task? *Antiviral Chem. Chemother.* **25**(3) 69–82.
- Aggarwal S.K., Gogu S.R., Rangan S.R., Agrawal K.C. (1990) Synthesis and biological evaluation of prodrugs of zidovudine. J. Med. Chem. 33(5), 1505–1510.
- 113. Morin K.W., Wiebe L.I., Knaus E.E. (1993) Synthesis of brain-targeted 1-(2-deoxy-2-fluoro- β -*D*-ribofuranosyl)-(*E*)-5-(2-iodovinyl)uracil coupled to a dihydropyridine \rightleftharpoons pyridinium salt redox chemical-delivery system. *Carbohydr. Res.* **249**(1), 109–116.
- 114. Kraevskii A.A. (1992) Search for new drugs for the treatment of HIV infections among nucleosides and nucleotides, II. *Pharm. Chem. J.* **26**(1), 33–47.
- Esnouf R., Ren J., Ross C., Jones Y., Stammers D., Stuart D. (1995) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat. Struct. Biol.* 2(4), 303–308.
- 116. (2005) Nucleoside Triphosphates and Their Analogs: Chemistry, Biotechnology, and Biological Applications, 1st ed. Ed. Vaghefi M. Boca Raton, FL: CRC press.
- 117. Zhou Z., Liu T., Wu G., Kang D., Fu Z., Wang Z., De Clercq E., Pannecouque C., Zhan P., Liu X. (2019) Targeting the hydrophobic channel of NNIBP: discovery of novel 1,2,3-triazole-derived diarylpyrimidines as novel HIV-1 NNRTIs with high potency against wild-type and K103N mutant virus. *Org. Biomol. Chem.* **17**(12), 3202–3217.
- Kang D., Feng D., Sun Y., Fang Z., Wei F., De Clercq E., Pannecouque C., Liu X., Zhan P. (2020) Structurebased bioisosterism yields HIV-1 NNRTIs with improved drug-resistance profiles and favorable pharmacokinetic properties. *J. Med. Chem.* 63(9), 4837–4848.
- 119. Kang D., Feng D., Ginex T., Zou J., Wei F., Zhao T., Huang B., Sun Y., Desta S., De Clercq E., Pannecouque C., Zhan P., Liu X. (2020) Exploring the hydrophobic channel of NNIBP leads to the discovery of novel piperidine-substituted thiophene[3,2-*d*]pyrimidine derivatives as potent HIV-1 NNRTIS. *Acta Pharm. Sin. B.* **10**(5), 878–894.
- 120. Jin K., Liu M., Zhuang C., De Clercq E., Pannecouque C., Meng G., Chen F. (2020) Improving the positional adaptability: structure-based design of biphenyl-substituted diaryltriazines as novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B.* **10**(2), 344–357.
- 121. Wang Z., Kang D., Feng D., Cherukupalli S., Jiang X., Fu Z., De Clercq E., Pannecouque C., Liu X., Zhan P. (2020) Targeting dual tolerant regions of binding pocket: discovery of novel morpholine-substituted diarylpyrimidines as potent HIV-1 NNRTIs with significantly improved water solubility. *Eur. J. Med. Chem.* 206, 112811.

- Bressanelli S., Tomei L., Rey F.A., De Francesco R. (2002) Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides. *J. Virol.* 76(7), 3482–3492.
- 123. Tomei L., Altamura S., Bartholomew L., Biroccio A., Ceccacci A., Pacini L., Narjes F., Gennari N., Bisbocci M., Incitti I., Orsatti L., Harper S., Stansfield I., Rowley M., De Francesco R., Migliaccio G. (2003) Mechanism of action and antiviral activity of benzimidazole-based allosteric inhibitors of the hepatitis C virus RNA dependent RNA polymerase. J. Virol. 77(24), 13225–13231.
- 124. Chan L., Reddy T.J., Proulx M., Das S.K., Pereira O., Wang W., Siddiqui A., Yannopoulos C.G., Poisson C., Turcotte N., Drouin A., Alaoui-Ismaili M.H., Bethell R., Hamel M., L'Heureux L., Bilimoria D., Nguyen-Ba N. (2003) Identification of *N*,*N*-disubstituted phenylalanines as a novel class of inhibitors of hepatitis C NS5B polymerase. *J. Med. Chem.* **46**(8), 1283–1285.
- 125. Tomei L., Altamura S., Bartholomew L., Bisbocci M., Bailey, C., Bosserman M., Cellucci A., Forte E., Incitti I., Orsatti L., Koch U., De Francesco R., Olsen D.B., Carroll S.S., Migliaccio G. (2004) Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by nonnucleosides. J. Virol. 78(2), 938–946.
- 126. Chan L., Das S.K., Reddy T.J., Poisson C., Proulx M., Pereira O., Courchesne M., Roy C., Wang W., Siddiqui A., Yannopoulos C.G., Nguyen-Ba N., Labrecque D., Bethell R., Hamel M., Courtemanche-Asselin P., L'Heureux L., David M., Nicolas O., Brunette S., Bilimoria D., Bedard J. (2004) Discovery of thiophene-2-carboxylic acids as potent inhibitors of HCV NS5B polymerase and HCV subgenomic RNA replication. Part 1: Sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14(3), 793–796.
- 127. Chan L., Pereira O., Reddy T.J., Das S.K., Poisson C., Courchesne M., Proulx M., Siddiqui A., Yannopoulos C.G., Nguyen-Ba N., Roy C., Nasturica D., Moinet C., Bethell R., Hamel M., L'Heureux L., David M., Nicolas O., Courtemanche-Asselin P., Brunette S., Bilimoria D., Bedard J. (2004) Discovery of thiophene-2-carboxylic acids as potent inhibitors of HCV NS5B polymerase and HCV subgenomic RNA replication. Part 2: Tertiary amides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14(3), 797–800.
- 128. Harper S., Avolio S., Pacini B., Di Filippo M., Altamura S., Tomei L., Paonessa G., Di Marco S., Carfi A., Giuliano C., Padron J., Bonelli F., Migliaccio G., De Francesco R., Laufer R., Rowley M., Narjes F. (2005) Potent inhibitors of subgenomic hepatitis C virus RNA replication through optimization of indole-*N*-acetamide allosteric inhibitors of the viral NS5B polymerase. *J. Med. Chem.* **48**(14), 4547–4557.
- 129. Biswal B.K., Wang M., Cherney M.M., Chan L., Yannopoulos C.G., Bilimoria D., James M.N.G. (2006) Non-nucleoside inhibitors binding to hepatitis C virus NS5B polymerase reveal a novel mechanism of inhibition. J. Mol. Biol. 361(1), 33–45.
- 130. Tatum H., Thuluvath P.J., Lawitz E., Martorell C., DeMicco M., Cohen S., Rustgi V., Ravendhran N., Ghalib R., Hanson J., Zamparo J., Zhao J., Cooney E., Treitel M., Hughes E. (2015) A randomized, placebocontrolled study of the NS5B inhibitor beclabuvir with

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

peginterferon/ribavirin for HCV genotype 1. J. Viral Hepat. 22(8), 658–664.

- 131. Toyota J., Karino Y., Suzuki F., Ikeda F., Ido A., Tanaka K., Takaguchi K., Naganuma A., Tomita E., Chayama K., Fujiyama, S., Inada Y., Yoshiji H., Watanabe H., Ishikawa H., Hu W., McPhee F., Linaberry M., Yin P.D., Swenson E.S., Kumada H. (2017) Daclatasvir/asunaprevir/beclabuvir fixed-dose combination in Japanese patients with HCV genotype 1 infection. J. Gastroenterol. 52(3), 385–395.
- Gentles R.G. (2019) Discovery of beclabuvir: a potent allosteric inhibitor of the hepatitis C virus polymerase. In: *HCV: The Journey from Discovery to a Cure*, vol. 1. Ed. Sofia M.J. *Topics in Medicinal Chemistry*. Springer, Cham. 193–228.
- 133. Balzarini J., Pérez-Pérez M.J., San-Félix A., Schols D., Perno, C.F., Vandamme, A.-M., Camarasa, M.-J., De Clercq E. (1992) 2',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-3'-spiro-5"-(4"-amino-1",2"-oxathiole-2",2"dioxide)pyrimidine (TSAO) nucleoside analogues: highly selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 that are targeted at the viral reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**(10), 4392–4396.
- 134. Balzarini J., Perez-Perez M.-J., San-Felix A., Velazquez S., Camarasa M.-J., De Clercq E., (1992) [2',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)]-3'-spiro-5"-(4"-amino-1",2"-oxathiole-2",2"-dioxide) (TSAO) derivatives of purine and pyrimidine nucleosides as potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1. Antimicrob. Agents Chemother. **36**(5), 1073–1080.
- 135. Balzarini J., Pérez-Pérez M.-J., San-Félix A., Camarasa M.-J., Bathurst I.C., Barr P.J., De Clercq E. (1992) Kinetics of inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase by the novel HIV-1-specific nucleoside analogue [2',5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-β-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5"-(4"-amino-1",2"-oxathiole-2",2"dioxide)thymine (TSAO-T). J. Biol. Chem. 267(17), 11831–11838.
- 136. Camarasa M.J., Pérez-Pérez M.J., Velázques S., San-Félix A., Alvarez R., Ingate S., Jimeno M.L., Karlsson A., De Clercq E., Balzarini J. (1995) TSAO derivatives: highly specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids.* 14(3–5), 585–594. https://doi.org/10.1080/15257779508012432
- 137. Balzarini J., Karlsson A., Vandamme A.-M., Pérez-Pérez M.-J., Zhang H., Vrang L., Öberg B., Bäckbro K., Unge T., San-Félix A., Velázquez S., Camarasa M.-J., De Clercq E. (1993) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains selected for resistance against the HIV-1-specific [2',5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-3'-spiro-5"-(4"-amino-1",2"-oxathiole-2",2"dioxide)]-β-D-pentofuranosyl (TSAO) nucleoside analogues retain sensitivity to HIV-1-specific nonnucleoside inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**(15), 6952–6956.
- 138. Alvarez R., Jimeno M.-L., Pérez-Pérez M.-J., De Clercq E., Balzarini J., Camarasa M.-J. (1997) Synthesis and anti-human immunodeficiency virus type 1

activity of novel 3'-spiro nucleoside analogues of TSAO-T. Antiviral Chem. Chemother. 8(6), 507–517.

- 139. Angusti A., Manfredini S., Durini E., Ciliberti N., Vertuani S., Solaroli N., Pricl S., Ferrone M., Fermeglia M., Loddo R., Secci B., Visioli A., Sanna T., Collu G., Pezzullo M., La Colla P. (2008) Design, synthesis and anti *Flaviviridae* activity of N⁶-, 5',3'-Oand 5',2'-O-substituted adenine nucleoside analogs. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo). 56(4), 423–432.
- 140. De Burghgraeve T., Selisko B., Kaptein S., Chatelain G., Leyssen P., Debing, Y., Jacobs M., Van Aerschot A., Canard B., Neyts J. (2013) 3',5'Di-O-trityluridine inhibits *in vitro* flavivirus replication. *Antiviral Res.* 98(2), 242–247.
- 141. Chatelain G., Debing Y., De Burghgraeve T., Zmurko J., Saudi M., Rozenski J., Neyts J., Van Aerschot A. (2013) In search of flavivirus inhibitors: evaluation of different tritylated nucleoside analogues. *Eur. J. Med. Chem.* 65, 249–255.
- 142. Saudi M., Zmurko J., Kaptein S., Rozenski J., Neyts J., Van Aerschot A. (2014) In search of *Flavivirus* inhibitors part 2: tritylated, diphenylmethylated and other alkylated nucleoside analogues. *Eur. J. Med. Chem.* **76**, 98–109.
- 143. Vernekar S.K.V., Qiu L., Zhang J., Kankanala J., Li H., Geraghty R.J., Wang Z. (2015) 5'-Silylated 3'-1,2,3triazolyl thymidine analogues as inhibitors of West

Nile virus and dengue virus. J. Med. Chem. 58(9), 4016-4028.

- 144. McGuigan C., Serpi M., Slusarczyk M., Ferrari V., Pertusati F., Meneghesso S., Derudas M., Farleigh L., Zanetta P., Bugert J. (2016) Anti-flavivirus activity of different tritylated pyrimidine and purine nucleoside analogues. *ChemistryOpen.* 5(3), 227–235.
- 145. Eyer L., Nencka R., De Clercq E., Seley-Radtke K., Růžek D. (2018) Nucleoside analogs as a rich source of antiviral agents active against arthropod-borne flaviviruses. *Antiviral Chem. Chemother.* 26, 2040206618761299.
- 146. St.Vincent M.R., Colpitts C.C., Ustinov A.V., Muqadas M., Joyce M.A., Barsby N.L., Epand R.F., Epand R.M., Khramyshev S.A., Valueva O.A., Korshun V.A., Tyrrell D.L.J., Schang L.M. (2010) Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107(40), 17339–17344.
- 147. Orlov A.A., Chistov A.A., Kozlovskaya L.I., Ustinov A.V., Korshun V.A., Karganova G.G., Osolodkin D.I. (2016) Rigid amphipathic nucleosides suppress reproduction of the tick-borne encephalitis virus. *Med. Chem. Comm.* 7(3), 495–499.
- 148. Strasfeld L., Chou S. (2010) Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **24**(2), 413–437.

ANTIVIRAL AND ANTIMICROBIAL NUCLEOSIDE DERIVATIVES: STRUCTURAL FEATURES AND MECHANISMS OF ACTION

A. A. Zenchenko¹, M. S. Drenichev¹, *, I. A. Il'icheva¹, and S. N. Mikhailov¹

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: mdrenichev@mail.ru

The appearance of new viruses and resistant strains of pathogenic microorganisms generates a great need in novel antiviral and antimicrobial medicines. Nucleosides represent a promising class of natural compounds that meets the problem of creating new antiviral, antibacterial and anticancer drugs. In this paper, the structural and functional features and mechanisms of action of the known nucleoside analogues possessing antimicrobial activities are discussed. Among them, there are mechanisms that determine the antiviral effect of nucleoside analogues containing hydrophobic fragments. Depending on the structure and position of the hydrophobic substituent, such nucleosides can either block the process of virus penetration into cells or inhibit enzymatic reactions of virus replication. Inhibition mechanisms of viral enzymes by nucleoside and non-nucleoside compounds were compared as well. An important part of the paper is devoted to creation of antiparasitic drugs, which are based on the data on the features of metabolic transformations of nucleosides both in the human and parasitic cells. A new approach to the development of drugs using prodrug forms of modified nucleosides, which are converted into an effective drug directly in the target organ or tissue as a result of metabolic processes was described in details. This strategy can reduce the overall toxicity of the drug to patients and increase the effectiveness of its action in virus-infected cells.

Keywords: nucleoside biosynthesis, antibacterial activity, antiviral activity, antiprotozoal activity, RNA-containing viruses, SARS-CoV-2, target enzymes, hydrophobic nucleoside derivatives ———— ОБЗОРЫ ———

УДК 577.24

ПОЛНОГЕНОМНЫЕ ДУПЛИКАЦИИ В ЭВОЛЮЦИИ, ОНТОГЕНЕЗЕ И ПАТОЛОГИИ: РЕЗЕРВ СЛОЖНОСТИ И ЗАПАСА ПРОЧНОСТИ

© 2021 г. О. В. Анацкая^{а,} *, А. Е. Виноградов^а

^аИнститут цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064 Россия *e-mail: olga.anatskaya@gmail.com Поступила в редакцию 03.03.2021 г. После доработки 07.05.2021 г. Принята к публикации 13.05.2021 г.

Полногеномные дупликации (ПГД), или полиплоидия – это удвоение геномов, которое увеличивает количество генетической информации в клетке. ПГЛ целых организмов встречаются во всех ветвях эукариот и являются движущей силой видообразования, усложнения и адаптаций. ПГД найдены в соматических клетках всех типов тканей, они могут быть результатом нормальных и измененных онтогенетических программ, регенерации, патологических состояний, старения, малигнизации и метастазирования. Несмотря на универсальность ПГД, их функциональное значение, общие свойства и причины повышенной адаптивности недостаточно ясны. Сопоставление полнотранскриптомных данных и сведений из разных областей молекулярной биологии, геномики и молекулярной медицины показало, что полиплоидия как организмов, так и соматических и раковых клеток ассоциирована с рядом общих признаков, которые позволяют понять, какие именно свойства ПГД приводят к возникновению адаптивного фенотипа. Адаптивность ПГД может быть связана с увеличением сложности регулящии сетей и систем передачи сигналов, устойчивости к стрессу, активацией древних эволюционных программ одноклеточности, путей морфогенеза, выживания и продления жизни. В результате стресса возможен сдвиг баланса между клеточным и организменным уровнями контроля регуляции работы генов в сторону приоритета выживания клетки, что может привести к сердечно-сосудистым заболеваниям и раку. Представленные сведения помогают понять, как полиплоидия создает новые фенотипы и почему она является движущей силой эволюции и важным регулятором биологических процессов в соматических клетках, онтогенезе, патогенезе, регенерации и канцерогенезе.

Ключевые слова: полиплоидия, эволюция, регенерация, канцерогенез, старение, сложность регуляции, устойчивость к стрессу

DOI: 10.31857/S0026898421060021

введение

Полногеномные дупликации (ПГД), или полиплоидия, представляют собой удвоение геномов, которое увеличивает количество генетической информации в клетке. Этот процесс является фундаментальным дополнением к копированию ДНК, происходящему во время пролиферации клеток. ПГД играют важную роль в эволюции, нормальной физиологии, регенерации, старении, патологии и канцерогенезе [1, 2]. Если ПГД происходит в половых клетках, то потомство становится полностью полиплоидным, если в соматических, то полиплоидия возникает только в отдельных клетках некоторых тканей. В большинстве случаев полиплоидизация необратима и приводит к долгосрочным последствиям как в эволюции (организменная), так и в онтогенезе (соматическая) [1]. Несмотря на универсальность, биологическое значение ПГД на разных уровнях организации и в разных эволюционных масштабах остается неясным [2]. В то же время, выяснение причин накопления геномов в клетках и роли ПГД в регуляции биологических процессов в филогенезе, онтогенезе и патологии может иметь решающее значение для понимания процессов видообразования, адаптации, дифференцировки, регенерации, патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний и опухолевой трансформации. В настоящем обзоре представлены сведения об общих свойствах ПГД на разных уровнях организации, включая организмы, нормальные соматические и опухолевые клетки. Кроме того, рассмотрена важность ПГД для медицины, сельского хозяйства и биотехнологии.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ДУПЛИКАЦИЙ

Организмы

Фундаментальный закон эволюции (естественный отбор) следует из увеличения количества ор-

ганизмов в результате размножения, что приводит к конкуренции за ресурсы и естественному отбору. Однако рост сложности не следует из увеличения количества организмов. Он зависит от второго фундаментального процесса, ортогонального первому, а именно – удвоения количества информации в результате ПГД (увеличение информации может происходить из-за удвоения не только целых геномов, но и отдельных генов, но в этом обзоре мы рассматриваем только полногеномные дупликации). Сусуму Оно был первым, кто выдвинул эту концепцию [3]. Его основная идея состояла в том, что в результате дупликации дополнительная копия гена освобождается от стабилизирующего отбора, приобретая тем самым эволюционную пластичность. Он уделил особое внимание ПГД, которые полностью сохраняют регуляторные области и исходный баланс дозы генов, тем самым создавая основу для системных эволюционных изменений. В честь Оно гены, возникающие в результате организменной полиплоидии, назвали "онологами" [4].

ПГД на уровне организмов возникают в тех случаях, когда нередуцированные диплоидные гаметы, появление которых связано с нарушением деления клеток, сливаются с образованием полиплоидов [5]. В филогенетической линии сосудистых растений было два раунда древних ПГД (390 и 300 млн лет назад), как и в филогенетической линии позвоночных (оба около 500 млн лет, близко к кембрийскому взрыву) [6, 7]. Кроме того, более поздние полиплоидные штаммы, виды и надвидовые таксоны широко распространены в природе, сельском хозяйстве и аквакультуре. Они часто встречаются у растений, прокариот, протистов, грибов, беспозвоночных и холоднокровных позвоночных [8, 9]. После ПГД возникает репродуктивный барьер с исходным видом, поэтому полиплоидизация рассматривается в качестве способа мгновенного (instant) видообразования [10]. Количественные оценки распространенности полиплоидных видов могут быть только приблизительными, поскольку не у всех существующих видов проведен скрининг на наличие недавних ПГД. Предполагается, что около 35% видов высших (цветковых) растений являются недавними полиплоидами [10]. Интересно, что процент полиплоидных видов увеличивается при движении от экватора к более высоким широтам (что указывает на повышенную стрессоустойчивость полиплоидов). Так, наиболее высокий процент полиплоидов наблюдается в тундре (51%), в тайге их немного меньше (47%), в умеренной зоне еще меньше (38-40%), а в тропиках их менее 20% [10].

У животных можно найти оценки только для отдельных групп. Интересны группы с наибольшим процентом полиплоидов, поскольку они могут рассматриваться в качестве возможного верхнего предела. У рыб такой группой может быть

подсемейство карповых (Cyprininae), представленное 1300 видами, из которых около 400 полиплоидные, что составляет примерно 30% (возможно, однако, что не все остальные виды проверены) [11]. У амфибий рекордсменами являются лягушки рода Xenopus, у которых полиплоидны 26 из 27 видов (96%), включая тетраплоидов, октоплоидов и додекаплоидов [12]. Ситуация резко меняется при переходе к амниотам (и далее к теплокровным). Так, у рептилий полиплоиды возникают очень редко, обычно это триплоиды, которые не способны к половому размножению и воспроизводятся только партеногенетически. Таких видов около 0.6% [13]. У птиц и млекопитающих полиплоидные виды вообще не обнаружены. У лвух видов птиц описано спонтанное появление жизнеспособных триплоидов, но из-за своей стерильности они не могут образовывать новые виды [14]. Сообщалось о тетраплоидности одного из видов грызунов, однако позднее эти данные были опровергнуты [15].

Причины отсутствия полиплоидии у теплокровных животных пока не ясны. Известно, что полиплоидные эмбрионы млекопитающих гибнут еще на ранних стадиях (в основном на стадии бластоцисты) [16]. Наиболее правдоподобным нам кажется предположение, что причиной их гибели может быть взаимосвязь между полиплоидией и повышенной генетической нестабильностью, которая усиливается при переходе к теплокровности [17–19]. Известно, что теплокровность связана с активацией кислородного обмена и с усилением окислительного стресса, а также с АТР-зависимой декомпактизацией хроматина [20, 21]. Эти свойства могут ускорять накопление повреждений ДНК и лишать клетку способности к нормальному делению [18].

Примечательно, что некоторые модельные организмы являются относительно недавними полиплоидами (дрожжи, данио, ксенопус, арабидопсис) [1]. Полиплоиды могут возникать также в результате аллополиплоидизации, или слияния геномов разных видов [22, 23]. Важно отметить, что закрепление ПГД в эволюции происходит на фоне ряда негативных последствий. Это связано с нарушением коньюгации хромосом в мейозе, повышением вероятности анеуплоидии, эпигенетической нестабильности, избыточности регуляторного аппарата и изменения архитектуры клетки [24]. При этом следы древних геномных дупликаций сохранились практически у всех современных эукариот, что свидетельствует об адаптивных свойствах.

Нормальные соматические клетки

ПГД обнаружены в соматических клетках тканей всех многоклеточных, включая водоросли, мхи, лишайники, сосудистые растения, беспозвоночные и позвоночные животные, что подтверждает эволюционную успешность этого явления [1, 25].

Дупликация геномов, как правило, возникает в результате онтогенетических программ, инициирующих переключение с полного клеточного цикла на цикл незавершенный [26]. В результате происходит разобщение между репликацией ДНК и делением клетки. В зависимости от степени рестрикции последних фаз клеточного цикла это может приводить к эндомитозу или эндоредупликации с формированием полиплоидных клеток [27]. Полиплоидия может быть вызвана также слиянием клеток, например, при образовании синцития в миобластах и трофобласте [28].

У человека и теплокровных животных полиплоидные клетки формируются преимущественно в ходе нормального органогенеза сердца, коры головного мозга (пирамидные нейроны), ретины, печени, поджелудочной железы, плаценты, сосудов, кожи, крови и других органов [29]. Все этих органы и ткани характеризуются низкой способностью к самообновлению и постоянно высокой специфической нагрузкой, которая необходима для непрерывного обеспечения функций.

Как и в случае ПГД, соматическая полиплоидия сохраняется в эволюции на уровне организмов, несмотря на ряд побочных эффектов, включая нестабильность генома, изменение архитектуры клетки и энергетическую затратность поддержания дополнительных геномов, указывая на то, что преимущества полиплоидии перевешивают ее недостатки [30, 31].

Опухолевые клетки

Если ПГД возникают в соматических клетках, которые не запрограммированы на полиплоидизацию и обладают высоким пролиферативным потенциалом, то накопление геномов может способствовать онкотрансформации [32]. Недавнее исследование метастатических солидных опухолей, проведенное на 2520 парах транскриптомов опухолевых и нормальных тканей, выявило полиплоидные клетки в 56% всех образцов [33]. При этом процент полиплоидных клеток варьировал от 15% в опухолях нервной системы до 85% в опухолях пищевода [33]. Кроме того, обнаружена положительная корреляция между содержанием полиплоидных клеток в опухолях молочной, поджелудочной и щитовидной железы, глиобластомах, колоректальной карциноме, а также в опухолях костной ткани, почек, яичников, предстательной железы и другой локализации со степенью злокачественности, устойчивостью к терапии, рецидивами и плохим прогнозом [34, 35].

Опухолевые полиплоидные клетки формируются в результате запуска программ выживания в

трудных условиях и адаптации к стрессу [36]. Эти программы могут проявляться в виде выпадения последних фаз клеточного цикла, преждевременного вхождения в клеточный цикл, нерасхождения хромосом и многополюсности митоза [37-39]. Гигантские полиплоидные опухолевые клетки могут появляться путем слияния клеток, пульверизации хромосом (хромотрипсиса) и асинхронии митотических процессов в двуядерных клетках [26]. Удивительно, что полиплоидизация путем слияния различных типов клеток (эпигенетическая гибридизация), которая часто наблюдается при раке [28, 40], напоминает аллополиплоидизацию (генетическую гибридизацию) в эволюции и у сельскохозяйственных культур. Подобно аллополиплоидным организмам, гибридные полиплоидные клетки приобретают стрессоустойчивость (например, химио- и радиационную устойчивость) и адаптивную пластичность [1].

Важно отметить, что общим для нормальной и опухолевой полиплоидии является ряд сопровождающих их изменений, включая аномально большой размер клеток, склонность к митотическим катастрофам, анеуплоидии, изменению метаболизма и повреждению ДНК, а также изменение регуляторных программ, что предполагает существование у полиплоидных клеток адаптивных преимуществ, которые перевешивают их недостатки [37, 41, 42].

ОРГАНИЗМЕННОЙ И КЛЕТОЧНОЙ ПОЛНОГЕНОМНОЙ ДУПЛИКАЦИИ СВОЙСТВЕННА РЕДИПЛОИДИЗАЦИЯ

Редиплоидизация — это превращение полиплоидных наборов хромосом в диплоидные. Редиплоидизация означает не возврат к первоначальному диплоидному состоянию, а лишь восстановление правильной коньюгации хромосом вследствие их перестройки и дивергенции ДНК [43, 44].

Организмы

На уровне организмов редиплоидизация сопровождается потерей генов, субфункционализацией и неофункционализацией [45, 46]. Потеря генов происходит в результате делеции или псевдогенизации (мутационного разрушения гена, который больше не поддерживается естественным отбором). Субфункционализация — это разделение функции исходного гена, когда каждый из дупликатов выполняет только часть исходной функции (или всю функцию, но только в части тканей или стадий развития), тогда как неофункционализация — это приобретение новой функции [47, 48]. Субфункционализация и неофункционализация приводят к дивергенции генов, что должно сопровождаться интеграцией работы растущего числа диверсифицирующих генов [49]. В полногеномных исследованиях субфункционализация может быть выявлена по изменениям экспрессии генов и свойств интерактома (сети белковых взаимодействий). Изменения экспрессии можно обнаружить в тех случаях, когда каждая копия дуплицированного гена начинает экспрессироваться только в части тканей или стадий развития, в которых экспрессировался исходный ген. Изменения интерактома обнаружены у дрожжей. В этом случае белки, кодируемые онологами, имеют меньшее количество взаимодействий по сравнению с недуплицированными генами (и даже по сравнению с генами, появившимися в результате отдельных генных дупликаций, а не ПГД) [50]. Это свидетельствует о том, что субфункционализация была преобладающей тенденцией в эволюции сохранившихся онологов. Функциональный анализ перекрывающихся и неперекрывающихся интерактантов в каждой паре онологов показал, что регуляторные функции гораздо чаше встречаются в неперекрывающихся интерактантах, свидетельствуя о том, что именно регуляторные изменения были важны для дивергенции онологов.

Соматические клетки

В некоторых случаях запрограммированная в онтогенезе полиплоидизация может сменяться запрограммированным распадом клеток. В результате гигантские клетки с множеством геномов могут распадаться на клетки меньшей плоидности с помощью амитоза или редукционного деления [38, 39]. Например, полиплоидные энтероциты дрозофилы при голодании проходят через амитоз и образуют тканеспецифические стволовые клетки [51]. Подобным же образом культивируемые полиплоидные клетки костного мозга и гигантские клетки трофобласта могут разделяться на одноядерные клетки меньшей плоидности [52, 53].

Раковые клетки

Гигантские полиплоидные опухолевые клетки со стволовыми свойствами, как и полиплоидные клетки соматических тканей, способны распадаться на диплоидные потомки [35, 36, 42, 54]. Это явление, как правило, наблюдается в стареющих полиплоидных клетках, выживших после химио- или радиотерапии [55]. Диплоидизация происходит благодаря активации герминативных программ мейоза через включение консервативных регуляторов мейотической профазы оогенеза, например, киназы MOS и генов SPO11, DMC1, RAD51, REC8, OCT4A, VASA и FRAGILIS [35]. После диплоидизации снова наступает полиплоидизация через канонический клеточный цикл с потерей последних фаз деления [35, 36, 42, 54]. Чередование полиплоидных и диплоидных фаз жизненного цикла наделяет опухолевые клетки способностью к бессмертию и сопровождается активацией древних программ одноклеточности и выживания, неотъемлемой части канцерогенеза [35, 56]. Важно отметить, что распад гигантских полиплоидных опухолевых клеток происходит подобно тому, как это бывает у простейших, например, у кишечной амебы [55, 57, 58]. Таким образом, это явление можно рассматривать как аналогию эволюционной редиплоидизации, напоминающей чередование жизненных циклов простейших. При этом важно учитывать, что этот процесс не является возвратом к исходному диплоидному состоянию.

ПОЛНОГЕНОМНЫЕ ДУПЛИКАЦИИ СПОСОБСТВУЮТ УВЕЛИЧЕНИЮ СЛОЖНОСТИ, ВИДООБРАЗОВАНИЮ И ПОЯВЛЕНИЮ КЛЕТОК С НОВЫМИ СВОЙСТВАМИ

Организмы

Увеличение сложности регуляции и систем передачи сигналов - отличительная черта эволюции организмов после ПГД [1, 59]. Регуляторные гены сохраняются после ПГД, поскольку ослабленный стабилизирующий отбор позволяет переформатировать дуплицированные клеточные сети и развить новые функциональные возможности, увеличивающие биологическую сложность [2]. Примечательно, что в интерактоме человека одиночные древние гены (не онологи) имеют больше взаимодействий, чем новые гены, что указывает на постепенный эволюционный рост глобальной сети межгенных взаимодействий от центральной части к периферии [60]. Однако во время основного этапа развития многоклеточной организации от Bilateria до Euteleostomi (костных позвоночных) наблюдается плато, когда число взаимодействий новых генов остается на том же уровне. Это плато связано с серией полногеномных дупликаций и указывает на то, что ПГД удваивают и центральную часть интерактома, которая наиболее богата взаимодействиями. Таким образом, сложность интерактома повышается скорее в результате ПГД, чем дупликации отдельных генов. В дополнение к увеличению сложности полиплоидные организмы обладают повышенной эволюционной пластичностью [61]. Часто за событиями ПГД следует крупномасштабная радиация видов в пределах таксономической группы, что указывает на важность геномных дупликаций для видообразования [62].

Соматические клетки

В соматических клетках ПГД также способствуют возникновению новых признаков. Например, в гепатоцитах, кардиомиоцитах, интерстициальных

клетках сердца и стволовых клетках жировой ткани наблюдаются тотальные изменения транскриптома, которые проявляются в основных метаболических и сигнальных путях, включая активацию древних генов и ответа на стресс, изменяются также пути пролиферации, метаболизма и морфогенеза [63–67]. ПГД способствуют также образованию клеток с новой специализацией [68]. В частности, показано, что полиплоидные клетки костного мозга могут быть источником одноядерных диплоидных мезенхимных стволовых клеток, а дифференцированные энтероциты дрозофилы способны превращаться в стволовые клетки кишечника [51, 53]. Интересно отметить эволюционную консервативность феномена распада полиплоидных клеток с образованием диплоидных потомков с новыми свойствами.

Опухолевые клетки

Подобно соматическим клеткам, полиплоидные клетки соматических опухолей приобретают новые характеристики, такие как эмбриональность, способность к миграции, устойчивость к стрессу, перестройка путей пролиферации, метаболизма и ответа на повреждение ДНК [35, 36, 57, 69, 70]. Полнотранскриптомное изучение особенностей контроля клеточного цикла в гигантских полиплоидных клетках рака молочной железы показало, что полиплоидия ассоциирована, с одной стороны, с повышенной экспрессией генов контрольных точек G2/М (по-видимому, это ответ на повреждение ДНК), с другой – с пониженной экспрессией генов контрольных точек G1/S и генов цитокинеза [66]. Это явление характерно и для стволовых клеток [71-73]. Возможно, что избыточная активация контрольной точки G1/S (которая может быть связана с повреждением ДНК) задерживает переход G2/М. Предполагается также, что полиплоидизация опухолевых клеток обусловлена адаптацией к репликативному и метаболическому стрессу [66, 74–76].

Существует еще одна важная особенность полиплоидных опухолевых клеток — проявление древних эволюционных программ и признаков одноклеточности [41, 57, 58]. Атавистическая теория онкогенеза предполагает, что рак является возвратом от многоклеточного состояния к одноклеточному и часто связан с полиплоидизацией [58, 77, 78]. Недавно показали, что при раке повышается экспрессия генных модулей одноклеточного эволюционного происхождения, тогда как экспрессия модулей многоклеточного происхождения снижается [67, 79, 80]. Возможно, это и приводит к распаду полиплоидных гигантов на мелкие клетки со стволовыми свойствами.

Примечательно, что околодиплоидные потомки полиплоидных опухолевых клеток со стволовыми свойствами также проявляют черты эмбриональности, экспрессируют основные маркеры плюрипотентности и способны распространяться далеко за пределы опухоли [35, 36, 81, 82]. В дальнейшем такие клетки могут дифференцироваться в разные типы клеток, которые экспрессируют маркеры эндотелия, фибробластов, макрофагов, эритроцитов, адипоцитов и даже миоэпителиальных клеток [83, 84]. Эти свойства полиплоидных опухолевых клеток согласуются с гипотезой о возможной роли опухоли в эволюции организмов, согласно которой опухоль представляет собой источник дополнительных клеточных масс, экспрессирующих эволюционно новые гены, которые определяют морфологические новшества и эволюционные инновации [85, 86]. Эти свойства показывают также, что полиплоилия в соматических и опухолевых клетках может быть источником клеток нового типа, подобно тому как ПГД организмов способствуют видообразованию.

ПОЛНОГЕНОМНЫЕ ДУПЛИКАЦИИ ПОВЫШАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ К СТРЕССУ

Организмы

Полиплоидам свойственна более высокая устойчивость к болезням и стрессу, чем диплоидам [87, 88]. Полиплоиды особенно адаптивны при резких изменениях среды [1, 89]. Многие эволюционные линии, претерпевшие ПГД, выжили во время глобальных вымираний в отличие от их неполиплоидных предков, что указывает на повышенную адаптивность к стрессовым условиям и экологическим катастрофам [62]. Исследования, проведенные на дрожжах, свидетельствуют о том, что полиплоидия может ускорить эволюционную адаптацию к сложной окружающей среде благодаря пластичности и адаптивности регуляторных сетей [42, 90]. На модельных (дигитальных) организмах показано, что ПГД способствует адаптации к нестабильным и стрессовым условиям, в то время как в благоприятных условиях поддержание ПГД, напротив, снижает адаптивность [89, 91]. Природа преимуществ геномных дупликаций в стрессовых условиях и их недостатков в обычных условиях пока не ясна. Одна из гипотез предполагает, что в стабильной среде случайные мутации в генах регуляторных сетей часто бывают вредными, а в стрессовой среде, напротив, эти изменения повышают пластичность и открывают дорогу радикальным адаптациям, необходимым для выживания [91].

Соматические клетки

В соматических клетках ПГД (как и на уровне организмов) способствует адаптации к стрессу. Изучение кардиомиоцитов разных видов теплокровных показало, что самое большое число геномов характерно для видов, способных выживать в экстремальных условиях [92, 93]. Например, у

птиц максимальная плоидность клеток наблюдается у дальних мигрантов — представителей отряда Anseriformes (гусей и уток) [94, 95]. Эти птицы не способны переносить высокие аэробные нагрузки такие, например, как быстрый и маневренный полет, зато они приспособлены к нагрузке, связанной с длительным полетом в условиях гипоксии. При миграции птицы совершают длительные перелеты (по 7-8 ч) на высоте 8-10 км при содержании кислорода около 30% от нормального уровня и при температуре примерно -40°С [94, 95]. Среди млекопитающих самая высокая плоидность кардиомиоцитов характерна для человека, у которого каждая нормальная клетка содержит 4–16 геномов [96]. У человека повышенная нагрузка на сердце связана с прямохождением [96]. Важно отметить, что при гипоксических состояниях, вызванных, например, тетрадой Фалло, гипертонией и ишемией, кардиомиоциты человека могут накапливать до 64 и даже 128 геномов [96–98].

Существование взаимосвязи между ПГД в кардиомиоцитах и стрессом подтверждают и экспериментальные данные. На модели неонатальных крыс показано, что воспалительный стресс, вызванный инфекционным гастроэнтеритом, приводит к избыточной и необратимой полиплоидизации в мышечных клетках сердца и печени [99-103]. Показано также, что преждевременное попадание недоношенных ягнят в кислородную среду приводит к необратимому накоплению одноядерных полиплоидных клеток в правом и левом желудочках сердца [104]. Авторы этих независимых исследований пришли к общему выводу, что стресс во время дифференцировки может привести к избыточному накоплению геномов и к онтогенетическому программированию сердечно-сосудистых заболеваний [99, 104, 105].

Множество других примеров взаимосвязи между соматической полиплоидией и устойчивостью к гипоксическому, осмотическому, окислительному, токсическому, стрессу в разных типах клеток млекопитающих, растений, насекомых и других многоклеточных и одноклеточных эукариот приведены в обзорах [2, 106].

Важно отметить, что ПГД в соматических клетках, как и в организмах, повышают адаптацию к стрессу, но снижают адаптацию к нормальным условиям. Исследования ПГД в гепатоцитах и кардиомиоцитах нескольких десятков видов млекопитающих и птиц с разным функциональным потенциалом сердца и печени показали, что максимальная полиплоидизация гепатоцитов и кардиомиоцитов характерна для животных с небольшим метаболическим диапазоном и низким индексом сердца, а значит, ассоциирована со снижением функционального потенциала органов [95, 107–109]. Показано также, что увеличение количества ДНК в ядре повышает устойчивость конденсированного состояния хроматина к колебаниям ионного состава среды, окружающей клетку [110].

Опухолевые клетки

В клетках опухолей, которые подвергаются стрессу, например, из-за потери кровоснабжения, накопления токсичных метаболитов, изменения рН, иммунной инфильтрации и терапии, ПГЛ является одним из механизмов адаптации к стрессу [2, 70, 111]. Первые экспериментальные данные, подтверждающие роль стресса в формировании гигантских полиплоидных опухолевых клеток, получены в опытах, проведенных на опухолевых клетках, культивируемых в условиях гипоксии или с применением химических индукторов гипоксии [84, 112]. Позже показали, что полиплоидные опухолевые клетки могут возникать и после воздействия химио- и радиотерапии, механического стресса и вирусной инфекции [68, 113, 114].

Многочисленные исследования свидетельствуют о том. что гигантские полиплоидные клетки особенно характерны для метастатических форм опухолей, резистентных к химио- и радиотерапии [57, 113–115]. Дополнительные геномы усиливают приспособляемость к быстро меняющимся условиям среды благодаря тому, что геномные копии защищают клетку от повреждения ДНК и вредных мутаций и делают адаптационную перестройку регуляторных путей более обширной [111, 115]. Повышенной адаптивности полиплоидных опухолевых клеток способствует также усиленная способность к метастазированию и подвижности, что в некоторых случаях позволяет быстро выйти из неблагоприятных условий, например, из гипоксии [112]. Кроме того, гигантские полиплоиды способны впадать в состояние метаболического покоя (dormancy), что позволяет пережить периоды сильного стресса, связанного, например, с химио- и радиотерапией [113]. После нормализации условий, полиплоидные гиганты распадаются на множество мелких диплоидных или парадиплоидных потомков, которые также обладают высокой адаптивностью [36, 42, 82].

ОБЩИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ДУПЛИКАЦИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Недавние исследования показали, что ПГД могут существенно влиять на транскриптом клеток, генные модули и структуру сетей межбелковых взаимодействий [63, 65, 66, 101, 116, 117]. К наиболее важным проявлениям ПГД относятся активация путей морфогенеза, устойчивость к стрессу и включение древних программ одноклеточности [58, 66, 117], а их иллюстрацией служат

биоинформатические данные, полученные с помощью попарно-перекрестного сравнения транскриптомов сердца и печени человека и мыши [101, 116, 117]. Эти пары органов были выбраны потому, что для них характерны сильные различия в полиплоидизации. Так, кардиомиоциты человека имеют полиплоидные ядра, а гепатоциты содержат диплоидные ядра, тогда как у мыши, напротив, кардиомиоциты имеют диплоидные ядра, а гепатоциты – полиплоидные [116]. Средняя плоидность ядер гепатоцитов человека и мыши составляет 2.05 ± 0.01 и 5.47 ± 0.10 геномов, соответственно, в то время как средняя плоидность ядер кардиомиоцитов человека и мыши равна 4.04 ± 0.05 и 2.05 ± 0.01 геномов [30].

Метод попарно-перекрестного сравнения транскриптомов позволил исключить видо- и тканеспецифические эффекты и идентифицировать эффекты полиплоидии. Показано, что полиплоидия ассоциирована с проявлениями морфогенетических программ (пути Notch, TGFb, Hippo, WNT и др.), усилением ответа на гипоксию, активацией гликолиза и снижением активности путей апоптоза, иммунного ответа и аэробного метаболизма [30, 101, 116, 117]. Кроме того, выявлена тесная ассоциация между полиплоидией и усилением протеасомной деградации белка [66, 117, 118], которая также может быть ассоциирована с проявлениями стволовости [119]. Взаимосвязь между полиплоидией и эмбриональностью подтверждают также данные о том, что ПГД способствуют активации интерактома онкогена с-Мус и усилению экспрессии генов из древних филострат, относящихся к одноклеточной стадии эволюции [66, 117]. К проявлениям адаптации к стрессу можно отнести усиленный ответ на повреждение ДНК, а также окислительный, биотический и абиотический стрессы [116].

Результаты исследований, проведенных на мышечных и интерстициальных клетках сердца человека и мыши, энтероцитах дрозофилы и ретиноцитах человека в культуре, подтверждают, что полиплоидия может быть ассоциирована с проявлениями эмбриональности, усилением синтеза ДНК и ответа на стресс [64, 96]. Кроме того, накопилось большое количество сведений о том, что полиплоидия способствует адаптации к окислительному, воспалительному, гипоксическому и генотоксическому стрессу [27, 120].

Причиной изменения активности транскриптома при ПГД могут быть эпигенетические модификации хроматина, связанные с метилированием ДНК, модификациями гистонов и негистоновых регуляторов хроматина, например, HNMGB1 и HMGB2, а также с изменением экспрессии микроРНК [121–125]. Исследования, проведенные на гепатоцитах и кардиомиоцитах, выявили взаимосвязь между полиплоидией и декомпакти-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

зацией хроматина [121, 126, 127]. Показано также, что при полиплоидии может возникать изменение баланса антагонистической активности метилтрансферазных комплексов гистонов Trithorax и Polycomb, которые регулируют метилирование гистонов в CpG-богатых областях и модулируют экспрессию многих генных модулей, как это происходит, например, в кардиомиоцитах, децидуальных клетках, гепатоцитах, клетках карциномы в культуре и клетках растений [104, 121, 128, 129].

Недавно обнаружили взаимосвязь между ПГД и повышенной экспрессией бивалентных генов, содержащих активаторные (H3K4me3) и репрессорные (H3K27me3) домены хроматина [66]. Бивалентные гены часто совпадают с генами транскрипционных факторов, вовлеченных в изменение клеточной судьбы, эмбриогенез и канцерогенез [130]. Наделяя клетку способностью к быстрому изменению паттерна экспрессии генов, бивалентные гены также способствуют возникновению адаптационных самоорганизующихся регуляторных сетей [42]. Адаптация генных сетей включает поиск оптимальных состояний клетки, что дает возможность совмещать несовместимые (в диплоидном состоянии) процессы, например, старение и стволовость, аэробное дыхание и анаэробный гликолиз, а также эволюционно древние программы одноклеточности и относительно молодые программы многоклеточности [42]. В результате, полиплоидные клетки обладают более высокой адаптивностью и жизнеспособностью, чем диплоидные [82, 111].

Важно отметить, что основные особенности транскриптома соматических полиплоидных клеток совпадают с транскриптомом фибробластов долгоживущих видов, например, голого землекопа и слепыша, а также у мутантов мыши, нематоды, дрозофилы и дрожжей с повышенной продолжительностью жизни [131-133]. Это, например, ответ на гипоксию, индукция путей репарации, пролиферации, морфогенеза, гликолиза, протеасомной деградации белка, адаптация к стрессу, а также негативная регуляция апоптоза и замедление аэробного метаболизма [27, 134, 135]. ПГД на уровне отдельных клеток увеличивает продолжительность жизни клеток в тканях и в культуре, в основном, из-за их повышенной устойчивости к апоптозу, мутациям и генетической нестабильности [1].

Фундаментальность перечисленных свойств соматической полиплоидии подтверждает то, что ряд аналогичных генных модулей сохранился в дуплицированном состоянии у древних полиплоидов, таких как дрожжи, арабидопсис, аксолотль, ксенопус и костистые рыбы [1, 106]. К таким дуплицированным модулям относятся биогенез рибосом, транскрипция, пролиферация, гликолиз, адаптация к гипоксическому и окислительному

АНАЦКАЯ, ВИНОГРАДОВ



Рис. 1. Общие черты организменной и соматической полиплоидии.

стрессу и негативная регуляция апоптоза [106, 136]. Аналогично, генные модули, ингибированные при соматической полиплоидии (аэробное дыхание, сигнальная трансдукция, транспорт, апоптоз и иммунный ответ), у тех же древних полиплоидов содержат гены, утратившие дупликаты. Этот факт предполагает общие свойства между организменной и соматической полиплоидией. Вполне вероятно, что адаптация к стрессу, которая, по-видимому, способствует возникновению соматической полиплоидии, может играть важную роль в эволюционной фиксации полиплоидии на уровне организма.

Таким образом, свойства транскриптома, связанные с полиплоидией, консервативны в филогенезе и онтогенезе и направлены на усиление выживаемости в новых условиях, адаптивности к стрессу и увеличение продолжительности жизни (рис. 1). Вовлеченность геномных дупликацией в регуляцию программ развития, продолжительности жизни и адаптации к стрессу делают особенно важным изучение роли полиплоидии в патологических и физиологических процессах, которые могут затрагивать постнатальный морфогенез и адаптацию, включая онтогенетическое программирование широко распространенных заболеваний, регенерацию тканей и процессы опухолевой трансформации. В связи с этим мы подробнее рассмотрим данные, которые могут прояснить роль полиплоидии в медицине.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОЛНОГЕНОМНЫХ ДУПЛИКАЦИЙ

Онологи и болезни

Сохранившиеся онологи человека — это чувствительные к дозе гены [137—139]. Чувствительность к дозе генов вызывает все больший интерес, поскольку может дать ключ к патогенезу многих заболеваний [138]. Модель баланса дозы генов предполагает, что среди всех комплексных генных продуктов в биохимическом пути поддерживается стехиометрическое равновесие, поэтому изменение экспрессии, мутация или вариация числа копий даже в одном гене пути могут быть вредными. Изменения в паттерне экспрессии онологов обнаруживаются при различных типах рака (молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, щитовидной железы, яичника, мочевого пузыря, шейки матки, легких, матки) и в ангиогенезе опухолей [139]. Гены моногенных заболеваний человека, представленные в базе данных ОМІМ, обогащены онологами [138].

Полногеномные дупликации в опухолевых клетках

До недавнего времени полиплоидные опухолевые клетки считали безопасными. потому что их рассматривали как необратимо стареющие клетки, утратившие способность к делению [111]. Лишь относительно недавно показали, что эти многоядерные гиганты обладают стволовыми свойствами и являются важными факторами онкогенности, метастазирования и устойчивости к ядам [58, 140-144]. Полиплоидные клетки присутствуют у пациентов с метастатическими опухолями всех типов, они найдены в опухолевых линиях всех типов [111, 115]. Многочисленные клинические и экспериментальные данные, полученные на разных моделях, подтверждают гипотезу о том, что устойчивость опухолевых клеток к терапии обусловлена появлением в их популяции полиплоидов, и такие клетки могут выживать после химио- и радиотерапии [113, 115, 140]. Многие исследователи считают, что гигантские полиплоидные опухолевые клетки, обладающие повышенной биологической и эпигенетической пластичностью и способностью к метастазированию, являются главными виновниками летальности [115, 145]. К опасным свойствам относят также склонность этих клеток впадать в состояние покоя в ответ на терапию и редиплоидизироваться после нормализации условий микроокружения. Таким образом, полиплоидные опухолевые клетки имеют важное клиническое значение, а разработка подходов к их элиминации представляет важную задачу терапии опухолей.

Полиплоидия при регенерации

ПГД считается важным фактором сохранения функции и выживания клеток при повреждениях [29, 62]. Полиплоидные клетки участвуют в регенерации органов и тканей, состоящих из терминально дифференцированных клеток, где отсутствуют резидентные стволовые клетки, поэтому восстановление с помощью пролиферации диплоидных клеток невозможно [120]. Например, так происходит в сердце человека и млекопитающих, где полиплоидия может быть единственным способом сохранения постоянной функциональности при повреждающих воздействиях [96–98. 146, 147]. Участие ПГД в регенерации связано с большей устойчивостью полиплоидных клеток по сравнению с диплоидными, что особенно необходимо при восстановлении. Например, при необходимости быстрого восстановления функции полиплоидия дает возможность увеличить размер клетки (хотя часто и непропорционально

числу геномов), минуя энергетически затратный митоз, который связан с реорганизацией цитоскелета, нарушением межклеточных контактов и архитектуры ткани [120]. Полиплоидия позволяет также продлить жизнь клеток благодаря повышенной устойчивости к геномному стрессу и апоптотическим сигналам [27]. Недавние полногеномные и экспериментальные исследования показали, что полиплоидия связана с переключением метаболизма на режим экономии энергии [93, 94]. Это наглядно проявляется в сердце, где полиплоидия, вызванная стрессом или гиперфункцией, приводит к замещению тяжелой цепи α-миозина (быстрой, взрослой и АТР-затратной) на тяжелую цепь β-миозина (медленную, эмбриональную и АТР-экономную) [100, 102, 103]. Эта взаимосвязь подтверждена на экспериментальных моделях заболеваний сердца, а также гипертонической болезни, дилатационной кардиомиопатии, инфаркте миокарда и ишемии [99, 125].

Способность полиплоидных клеток поддерживать функцию в условиях дефицита энергии и гипоксии подтверждают примеры из дикой природы. Например, около 80% ядер кардиомиоцитов голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) содержат четыре или более геномов [148]. Примечательно, что этот грызун, который обитает в токсических условиях при пониженной концентрации кислорода и живет 32 года, что примерно в 10 раз дольше, чем мышь сходного веса [132]. Известно, что кардиомиоциты других грызунов сходного веса содержат практически только диплоидные ядра [93, 149].

Важно отметить, что ПГД играет особенную роль в регенерации сердца человека, где скорость обновления кардиомиоцитов крайне низка. Недавно показали, что у пожилых людей (в возрасте около 75 лет) в миокарде за год обновляется всего около 0.4% кардиомиоцитов и около 55% кардиомиоцитов представлено клетками, сохранившимися с рождения [96]. В то же время, в миокарде человека преобладают полиплоидные кардиомиоциты. Например, в ядре практически каждого кардиомиоцита (около 90% клеток) здорового человека содержится 4-16 геномов [96, 97]. При патологической гиперфункции кардиомиоциты накапливают по 32, 64 или даже 128 геномов [97, 98]. Таким образом, ПГД является важным альтернативным способом восстановления ткани сердца [98]. Важно отметить, что активация ПГД в кардиомиоцитах патологически измененного сердца может быть в некоторых аспектах даже лучше. чем индукция митоза. С одной стороны, дополнительные ПГД могут улучшать сократительную функцию сердца в условиях гипоксического и механического стресса [97, 98], а с другой, дают возможность избежать побочных эффектов индукции митоза в виде массового апоптоза из-за нарушенной функции центриолей [98].

Полиплоидия может быть механизмом регенерации ткани при старении и заживлении ран, когда пролиферативного потенциала диплоидных клеток не хватает для восстановления дефектов ДНК, цитоскелета, и других компонентов клетки [2, 68]. Важная роль полиплоидии показана при восстановлении функции почек и сердца после ранения и инфаркта [120]. Недавно показали, что эпителиальные клетки почечных канальцев накапливают геномы в ответ на острое повреждение почек, а рост числа полиплоидных клеток помогает восстановить функцию органа [120]. В целом, можно сказать, что регенерация с помощью полиплоидии обеспечивает запас прочности организма при невозможности нормальной регенерации за счет пролиферации диплоидных клеток.

ПРИКЛАДНОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИПЛОИДИИ

Полиплоидия в биотехнологии сельского хозяйства и аквакультуры

Полиплоидия – один из ключевых факторов при одомашнивании сельскохозяйственных культур [23, 46, 150]. Случаев полиплоидии в истории одомашненных растений было больше, чем у их диких предшественников [150]. Генетическая пластичность множественных генов полиплоидного генома представляет особое преимущество для одомашнивания [62]. В число недавних полиплоидов входят такие основные культуры, как пшеница, овес, кукуруза, хлопок, картофель, бобовые, банан, сахарный тростник, рапс, клубника, кофе, горчица, табак. В основном это аллополиплоиды (т.е. результат полиплоидизации, связанной с гибридизацией). Гибридизация часто сопровождается повышенной гетерозиготностью и гетерозисом, тогда как полиплоидизация восстанавливает фертильность образовавшихся гибридов и способствует стабилизации гибридного генома [23].

Аллополиплоидизация открывает путь к созданию новых культур. Синтетические полиплоиды используются для улучшения агрономических признаков, поскольку обладают более высокой приспособленностью, устойчивостью к болезням, быстрым ростом и высокой продуктивностью по сравнению с их природными диплоидами [151, 152]. Так, например, синтетическая гексаплоидная пшеница представляет новый источник генетического разнообразия для получения растений, vстойчивых к множественному биотическому стрессу [88]. Многие искусственные полиплоиды используются в аквакультуре и большинство из них созданы из природных полиплоидных моллюсков и рыб, особенно карповых и лососевых [22]. Между родительскими субгеномами в полиплоидных гибридах возникает конкуренция, называемая "доминированием субгенома", когда

менее экспрессированный субгеном имеет тенденцию терять больше генов и цис-регуляторных элементов по сравнению с другим субгеномом [23, 46]. В крайних случаях родительские субгеномы могут даже сегрегировать отдельно в линии зародышевых клеток, и гибридное состояние возникает *de novo* в каждом поколении [153, 154]. Такое рекурсивное воспроизводство полиплоидных гибридов используется, когда аллополиплоиды стерильны или утрачивают свои гибридные свойства из-за инбридинга. Например, аллогексаплоидный карп массово воспроизводится путем скрещивания родительских видов в каждом поколении [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полиплоидия широко распространена на уровне целых организмов и в отдельных клетках тканей многоклеточных. Полиплоидия организмов является важной движущей силой эволюции. Увеличивая размах генетической изменчивости, полиплоидия повышает толерантность к широкому спектру стрессовых условий, способствует освоению новых экологических ниш и маскирует вредные последствия мутаций. Соматическая полиплоидия в той или иной степени присутствует во всех тканях многоклеточных организмов. У человека полиплоидные клетки образуются в ходе нормального органогенеза и считаются проявлением программ развития. Накопление геномов может также быть реакцией на стресс, проявлением канцерогенеза, старения и воспаления. Обширные сравнительные исследования показали, что полиплоидия, с одной стороны, усиливает адаптацию к выживанию в экстремальных условиях (особенно при гипоксии), а с другой стороны, ассоциирована со снижением функционального потенциала органов (сердца и печени). В генотоксических условиях, когда вхождение клетки в митоз неминуемо ведет к гибели, полиплоидия служит адаптивной заменой завершенного клеточного цикла. В зависимости от митотического потенциала клеток и тканей полиплоидия может быть опасной или полезной. С одной стороны, удвоение геномов - это эволюционно консервативный способ регенерации и обновления тканей, с другой, полиплоидия – это первый шаг к возникновению опухолеродных клеток и клеток, устойчивых к цитостатикам. Полнотранскриптомные сравнительные исследования показали, что полиплоидия организмов, а также соматических и раковых клеток ассоциирована с рядом общих признаков, которые позволяют понять, какие именно изменения в экспрессии приводят к возникновению адаптивного фенотипа. Это может быть как усилением эволюционно древних программ одноклеточности, которые повышают устойчивость к стрессу, так и активацией путей

морфогенеза, которые повышают биологическую пластичность и способствуют адаптивной перестройке обмена. Таким образом, в нашем обзоре показаны общие проявления ПГД на разном уровне организации, в разном эволюционном масштабе и в разных областях исследований. Интеграция данных эволюционной и молекулярной биологии, биохимии, цитологии и молекулярной медицины дала возможность идентифицировать набор эволюционно консервативных признаков ПГЛ. одновременно поддержанных отбором, которые целесообразно изучать в комплексе. Представленные сведения, улучшают понимание роли полиплоидии в эволюции, органогенезе, старении и канцерогенезе, что может способствовать разработке новых стратегий управления органогенезом и регенерацией, а также предотвращения трансформации клеток.

Авторы признательны Екатерине Эренпрейсе (Латвийский центр биомедицинских исследований и обучения), А.С. Цимохе, Е.В. Чихиржиной и И.Е. Негановой (ИНЦ РАН) за важные комментарии. Мы также признательны анонимным рецензентам за ценные рекомендации и исправления, которые улучшили обзор.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (программа "Экспансия", грант № 19-14-50401).

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. Van de Peer Y., Mizrachi E., Marchal K. (2017) The evolutionary significance of polyploidy. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 411–424.
- Fox D.T., Soltis D.E., Soltis P.S., Ashman T.L., Van de Peer Y. (2020) Polyploidy: a biological force from cells to ecosystems. *Trends Cell Biol.* 30, 688–694.
- 3. Ohno S. (1970) *Evolution by Gene Duplication*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- 4. Singh P.P., Isambert H. (2020) OHNOLOGS v2: a comprehensive resource for the genes retained from whole genome duplication in vertebrates. *Nucl. Acids Res.* **48**, D724–730.
- 5. Kreiner J.M., Kron P., Husband B.C. (2017) Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: associations with reproductive mode, life history and genome size. *New Phytol.* **214**, 879–889.
- 6. Clark J.W., Donoghue P.C.J. (2017) Constraining the timing of whole genome duplication in plant evolutionary history. *Proc. Biol. Sci.* **284**, 20170912.
- Murat F., Armero A., Pont C., Klopp C., Salse J. (2017) Reconstructing the genome of the most recent

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

common ancestor of flowering plants. *Nat. Genet.* **49**, 490–496.

- 8. Soppa J. (2017) Polyploidy and community structure. *Nat. Microbiol.* **2**, 16261.
- 9. Hu G., Wendel J.F. (2019) Cis-trans controls and regulatory novelty accompanying allopolyploidization. *New Phytol.* **221**, 1691–1700.
- Rice A., Šmarda P., Novosolov M., Drori M., Glick L., Sabath N., Meiri S., Belmaker J., Mayrose I. (2019) The global biogeography of polyploid plants. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 265–273.
- Yang L. Sado T., Hirt M.V., Pasco-Viel E., Arunachalam M., Li J.B., Wang X.Z., Freyhof J., Saitoh K., Simons A.M., Miya M., He S.P., Mayden R.L. (2015) Phylogeny and polyploidy: resolving the classification of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 85, 97–116.
- Evans B.J., Carter T.F., Greenbaum E., Gvoždík V., Kelley D.B., McLaughlin P.J., Olivier Pauwels S.G., Portik D.M., Stanley E.L., Tinsley R.C., Tobias M.L., Blackburn D.C. (2015) Genetics, morphology, advertisement calls, and historical records distinguish six new polyploid species of african clawed frog (*Xenopus*, Pipidae) from West and Central Africa. *PLoS One*. 10, e0142823.
- Moritz C., Bi K. (2011) Spontaneous speciation by ploidy elevation: laboratory synthesis of a new clonal vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 9733– 9734.
- Tiersch T.R., Beck M.L., Douglass M. (1991) ZZW autotriploidy in a blue-and-yellow macaw. *Genetica*. 84, 209–212.
- 15. Evans B.J., Upham N.S., Golding G.B., Ojeda R.A., Ojeda A.A. (2017) Evolution of the largest mammalian genome. *Genome Biol. Evol.* **9**, 1711–1724.
- Imai H., Fujii W., Kusakabe K.T., Kiso Y., Kano K. (2016) Effects of whole genome duplication on cell size and gene expression in mouse embryonic stem cells. J. Reprod. Dev. 62, 571–576.
- 17. Otto S.P., Whitton J. (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 401–437.
- 18. Ganem N.J., Pellman D. (2007) Limiting the proliferation of polyploid cells. *Cell*. **131**, 437–440.
- 19. Otto S.P. (2007) The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell.* **131**, 452–462.
- 20. Cutie S., Huang G.N. (2021) Vertebrate cardiac regeneration: evolutionary and developmental perspectives. *Cell Regen.* **10**, 6.
- Reyes A.A., Marcum R.D., He Y. (2021) Structure and function of chromatin remodelers. J. Mol. Biol. 433, 166929.
- Zhou L., Gui J. (2017) Natural and artificial polyploids in aquaculture. *Aquaculture and Fisheries.* 2, 103–111.
- Glombik M., Bačovský V., Hobza R., Kopecký D. (2020) Competition of parental genomes in plant hybrids. *Front. Plant. Sci.* 11, 200.

- Comai L. (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6, 836–846.
- Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Kudryavtsev B.N. (1994) Hepatocyte polyploidy and metabolism/lifehistory traits: hypotheses testing. *J. Theor. Biol.* 168, 191–199.
- Gemble S., Basto R. (2020) CHRONOCRISIS: when cell cycle asynchrony generates DNA damage in polyploid cells. *Bioessays*. 42, e2000105.
- Øvrebø J.I., Edgar B.A. (2018) Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration. *Development*. 145, dev156034.
- Brukman N.G., Uygur B., Podbilewicz B., Chernomordik L.V. (2019) How cells fuse. *J. Cell Biol.* 218, 1436–1451.
- 29. Gjelsvik K.J., Besen-McNally R., Losick V.P. (2019) Solving the polyploid mystery in health and disease. *Trends Genet.* **35**, 6–14.
- Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. (2007) Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver. *Genomics.* 89, 70–80.
- 31. Schoenfelder K.P., Fox D.T. (2015) The expanding implications of polyploidy. J. Cell Biol. 209, 485–491.
- 32. Varetti G., Pellman D. (2012) "Two" much of a good thing: telomere damage-induced genome doubling drives tumorigenesis. *Cancer Cell.* **21**, 712–714.
- Priestley P., Baber J., Lolkema M.P., Steeghs N., de Bruijn E., Shale C., Duyvesteyn K., Haidari S., van Hoeck A., Onstenk W., Roepman P., Voda M., Bloemendal H.J., Tjan-Heijnen V.C.G., van Herpen C.M.L., Labots M., Witteveen P.O., Smit E.F., Sleijfer S., Voest E.E., Cuppen E. (2019) Pan-cancer whole-genome analyses of metastatic solid tumours. *Nature*. 575, 210–216.
- White-Gilbertson S., Voelkel-Johnson C. (2020) Giants and monsters: unexpected characters in the story of cancer recurrence. *Adv. Cancer Res.* 148, 201–232.
- Salmina K., Bojko A., Inashkina I., Staniak K., Dudkowska M., Podlesniy P., Rumnieks F., Vainshelbaum N.M., Pjanova D., Sikora E., Erenpreisa J. (2020) "Mitotic slippage" and extranuclear DNA in cancer chemoresistance: a focus on telomeres. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2779.
- 36. Salmina K., Jankevics E., Huna A., Perminov D., Radovica I, Klymenko T., Ivanov A., Jascenko E., Scherthan H., Cragg M., Erenpreisa J. (2010) Up-regulation of the embryonic self-renewal network through reversible polyploidy in irradiated p53-mutant tumour cells. *Exp. Cell Res.* **316**, 2099–2112.
- Erenpreisa J., Kalejs M., Cragg M.S. (2005) Mitotic catastrophe and endomitosis in tumour cells: an evolutionary key to a molecular solution. *Cell Biol. Int.* 29, 1012–1018.
- Walen K.H. (2012) Genome reversion process of endopolyploidy confers chromosome instability on the descendent diploid cells. *Cell Biol. Int.* 36, 137–145.

- 39. Walen K.H. (2021) Cell cycle stress in normal human cells: a route to "first cells" (with/without fitness gain) and cancer-like cell-shape changes. *Semin. Cancer Biol.* https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.12.023
- Cho Y., Kim Y.K. (2020) Cancer stem cells as a potential target to overcome multidrug resistance. *Front Oncol.* 10, 764.
- 41. Liu J. (2018) The dualistic origin of human tumors. *Semin. Cancer Biol.* **53**, 1–16.
- Erenpreisa J., Salmina K., Anatskaya O., Cragg M.S. (2020) Paradoxes of cancer: survival at the brink. *Semin Cancer Biol.* S1044-579X(20)30269-8. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.12.009
- Du K., Klopp C., Woltering J.M., Adolfi M.C., Feron R., Prokopov D., Makunin A., Kichigin I., Schmidt C., Fischer P., Kuhl H., Wuertz S., Gessner J., Kloas W., Cabau C., Iampietro C., Parrinello H., Tomlinson C., Journot L., Postlethwait J.H., Braasch I., Trifonov V., Warren W.C., Meyer A., Guiguen Y., Schartl M. (2020) The sterlet sturgeon genome sequence and the mechanisms of segmental rediploidization. *Nat. Ecol. Evol.* 4, 841–852.
- 44. Robertson F.M., Gundappa M.K., Grammes F., Hvidsten T.R., Redmond A.K., Lien S., Martin S.A.M., Holland P.W.H., Sandve S.R., Macqueen D.J. (2017) Lineage-specific rediploidization is a mechanism to explain time-lags between genome duplication and evolutionary diversification. *Genome Biol.* 18, 111.
- Venkatachalam A.B., Parmar M.B., Wright J.M. (2017) Evolution of the duplicated intracellular lipidbinding protein genes of teleost fishes. *Mol. Genet. Genomics.* 292, 699–727.
- Cheng F., Wu J., Cai X., Liang J., Freeling M., Wang X. (2018) Gene retention, fractionation and subgenome differences in polyploid plants. *Nat. Plants.* 4, 258– 268.
- Lynch M., Force A. (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*. 154, 459–473.
- Conant G.C., Wolfe K.H. (2008) Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat. Rev. Genet.* 9, 938–950.
- Vinogradov A.E. (2009) Global versus local centrality in evolution of yeast protein network. *J. Mol. Evol.* 68, 192–196.
- Vinogradov A.E., Anatskaya O.V. (2009) Loss of protein interactions and regulatory divergence in yeast whole-genome duplicates. *Genomics.* 93, 534–542.
- 51. Lucchetta E.M., Ohlstein B. (2017) Amitosis of polyploid cells regenerates functional stem cells in the Drosophila intestine. *Cell Stem Cell.* **20**, 609–620.e6.
- Zybina T.G., Zybina E.V. (2020) Role of cell cycling and polyploidy in placental trophoblast of different mammalian species. *Reprod. Domest. Anim.* 55, 895– 904.
- 53. Ahmadbeigi N., Soleimani M., Vasei M., Gheisari Y., Mortazavi Y., Azadmanesh K., Omidkhoda A., Janzamin E., Nardi N.B. (2013) Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived cell

components with hematopoietic stem cell niche properties. *Stem Cells Dev.* **22**, 3052–3061.

- 54. Erenpreisa J., Cragg M.S. (2010) MOS, aneuploidy and the ploidy cycle of cancer cells. *Oncogene*. **29**, 5447–5451.
- Niu N., Mercado-Uribe I., Liu J. (2017) Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*. 36, 4887–4900.
- Niculescu V.F. (2019) The reproductive life cycle of cancer: hypotheses of cell of origin, TP53 drivers and stem cell conversions in the light of the atavistic cancer cell theory. *Med. Hypotheses.* 123, 19–23.
- 57. Liu J. (2020) The "life code": A theory that unifies the human life cycle and the origin of human tumors. *Semin. Cancer Biol.* **60**, 380–397.
- 58. Niculescu V.F. (2020) aCLS cancers: genomic and epigenetic changes transform the cell of origin of cancer into a tumorigenic pathogen of unicellular organization and lifestyle. *Gene.* **726**, 144174.
- 59. Corrochano L.M., Kuo A., Marcet-Houben M., Polaino S., Salamov A., Villalobos-Escobedo J.M., Grimwood J., Álvarez M.I., Avalos J., Bauer D., Benito E.P., Benoit I., Burger G., Camino L.P., Cánovas D., Cerdá-Olmedo E., Cheng J.F., Domínguez A., Eliáš M., Eslava A.P., Glaser F., Gutiérrez G., Heitman J., Henrissat B., Iturriaga E.A., Lang B.F., Lavín J.L., Lee S.C., Li W., Lindquist E., López-García S., Luque E.M., Marcos A.T., Martin J., McCluskey K., Medina H.R., Miralles-Durán A., Miyazaki A., Muñoz-Torres E., Oguiza J.A., Ohm R.A., Olmedo M., Oreias M., Ortiz-Castellanos L., Pisabarro A.G., Rodríguez-Romero J., Ruiz-Herrera J., Ruiz-Vázquez R., Sanz C., Schackwitz W., Shahriari M., Shelest E., Silva-Franco F., Soanes D., Syed K., Tagua V.G., Talbot N.J., Thon M.R., Tice H., de Vries R.P., Wiebenga A., Yadav J.S., Braun E.L., Baker S.E., Garre V., Schmutz J., Horwitz B.A., Torres-Martínez S., Idnurm A., Herrera-Estrella A., Gabaldón T., Grigoriev I.V. (2016) Expansion of signal transduction pathways in fungi by extensive genome duplication. Curr. Biol. 26, 1577-1584.
- Vinogradov A.E., Anatskaya O.V. (2019) Evolutionary framework of the human interactome: unicellular and multicellular giant clusters. *Biosystems*. 181, 82–87.
- Mattenberger F., Sabater-Muñoz B., Toft C., Fares M.A. (2017) The phenotypic plasticity of duplicated genes in *Saccharomyces cerevisiae* and the origin of adaptations. G3 (Bethesda). 7, 63–75.
- 62. Zhang K., Wang X., Cheng F. (2019) Plant polyploidy: origin, evolution, and its influence on crop domestication. *Horticult. Plant J.* **5**, 231–239.
- Katsuda T., Hosaka K., Matsuzaki J., Usuba W., Prieto-Vila M., Yamaguchi T., Tsuchiya A., Terai S., Ochiya T. (2020) Transcriptomic dissection of hepatocyte heterogeneity: linking ploidy, zonation, and stem/progenitor cell characteristics. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 161–183.

64. Broughton K.M., Khieu T., Nguyen N., Rosa M., Mohsin S., Quijada P., Wang B.J., Echeagaray O.H., Kubli D.A., Kim T., Firouzi F., Monsanto M.M., Gude N.A., Adamson R.M., Dembitsky W.P., Davis M.E., Sussman M.A. (2019) Cardiac interstitial tetraploid cells can escape replicative senescence in rodents but not large mammals. *Commun. Biol.* 2, 205.

- Fajka-Boja R., Marton A., Tóth A., Blazsó P., Tubak V., Bálint B., Nagy I., Hegedűs Z., Vizler C., Katona R.L. (2018) Increased insulin-like growth factor 1 production by polyploid adipose stem cells promotes growth of breast cancer cells. *BMC Cancer.* 18, 872.
- 66. Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Vainshelbaum N.M., Giuliani A., Erenpreisa J. (2020) Phylostratic shift of whole-genome duplications in normal mammalian tissues towards unicellularity is driven by developmental bivalent genes and reveals a link to cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8759.
- 67. Vinogradov A.E., Anatskaya O.V. (2020) Cell-cycle dependence of transcriptome gene modules: comparison of regression lines. *FEBS J.* **287**, 4427–4439.
- Moein S., Adibi R., da Silva Meirelles L., Nardi N.B., Gheisari Y. (2020) Cancer regeneration: polyploid cells are the key drivers of tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta – Rev. Cancer.* 1874, 188408.
- Krigerts J., Salmina K., Freivalds T., Zayakin P., Rumnieks F., Inashkina I., Giuliani A., Hausmann M., Erenpreisa J. (2021) Differentiating cancer cells reveal early large-scale genome regulation by pericentric domains. *Biophys. J.* **120**, 711–724.
- Pienta K.J., Hammarlund E.U., Brown J.S., Amend S.R., Axelrod R.M. (2021) Cancer recurrence and lethality are enabled by enhanced survival and reversible cell cycle arrest of polyaneuploid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **118**, e2020838118.
- Neganova I., Zhang X., Atkinson S., Lako M. (2009) Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene*. 28, 20–30.
- 72. Neganova I., Vilella F., Atkinson S.P., Lloret M., Passos J.F., von Zglinicki T., O'Connor J.E., Burks D., Jones R., Armstrong L., Lako M. (2011) An important role for CDK2 in G1 to S checkpoint activation and DNA damage response in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 29, 651–659.
- Neganova I., Tilgner K., Buskin A., Paraskevopoulou I., Atkinson S.P., Peberdy D., Passos J.F., Lako M. (2014) CDK1 plays an important role in the maintenance of pluripotency and genomic stability in human pluripotent stem cells. *Cell Death Dis.* 5, e1508.
- 74. Vinogradov A.E., Shilina M.A., Anatskaya O.V., Alekseenko L.L., Fridlyanskaya I.I., Krasnenko A., Kim A., Korostin D., Ilynsky V., Elmuratov A., Tsyganov O., Grinchuk T.M., Nikolsky NN. (2017) Molecular genetic analysis of human endometrial mesenchymal stem cells that survived sublethal heat shock. *Stem Cells Int.* **2017**, 2362630.

- 75. Shilina M.A., Grinchuk T.M., Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Alekseenko L.L., Elmuratov A.U., Nikolsky N.N. (2018) Cytogenetic and transcriptomic analysis of human endometrial MSC retaining proliferative activity after sublethal heat shock. *Cells.* 7, 184.
- Alekseenko L.L., Shilina M.A., Lyublinskaya O.G., Kornienko J.S., Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Grinchuk T.M., Fridlyanskaya I.I., Nikolsky N.N. (2018) Quiescent human mesenchymal stem cells are more resistant to heat stress than cycling cells. *Stem Cells Int.* 2018, 3753547.
- Vincent M.D. (2009) Optimizing the management of advanced non-small-cell lung cancer: a personal view. *Curr. Oncol.* 16, 9–21.
- Davies P.C.W., Lineweaver C.H. (2011) Cancer tumors as Metazoa 1.0: tapping genes of ancient ancestors. *Phys. Biol.* 8, 015001.
- 79. Vinogradov A.E. (2010) Human transcriptome nexuses: basic-eukaryotic and metazoan. *Genomics.* **95**, 345–354.
- Trigos A.S., Pearson R.B., Papenfuss A.T., Goode D.L. (2017) Altered interactions between unicellular and multicellular genes drive hallmarks of transformation in a diverse range of solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 6406–6411.
- Erenpreisa J., Salmina K., Huna A., Jackson T.R., Vazquez-Martin A., Cragg M.S. (2014) The "virgin birth", polyploidy, and the origin of cancer. *Oncoscience*. 2, 3–14.
- Matsumoto T., Wakefield L., Peters A., Peto M., Spellman P., Grompe M. (2021) Proliferative polyploid cells give rise to tumors via ploidy reduction. *Nat. Commun.* 12, 646.
- Zhang S., Mercado-Uribe I., Xing Z., Sun B., Kuang J., Liu J. (2014) Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*. 33, 116–128.
- Zhang S., Mercado-Uribe I., Sood A., Bast R.C., Liu J. (2016) Coevolution of neoplastic epithelial cells and multilineage stroma via polyploid giant cells during immortalization and transformation of mullerian epithelial cells. *Genes Cancer.* 7, 60–72.
- 85. Kozlov A.P. (2014) *Evolution by Tumor Neofunctionalization.* Elsevier/Acad. Press. 248 p.
- Kozlov A.P. (2019) The role of heritable tumors in evolution of development: a new theory of carcinoevo-devo. *Acta Naturae*. 11, 65–72.
- Ruiz M., Quiñones A., Martínez-Cuenca M.R., Aleza P., Morillon R., Navarro L., Primo-Millo E., Martínez-Alcántara B. (2016) Tetraploidy enhances the ability to exclude chloride from leaves in *Carrizo citrange* seedlings. *J. Plant Physiol.* 205, 1–10.
- Bhatta M., Morgounov A., Belamkar V., Wegulo S.N., Dababat A.A., Erginbas-Orakci G., Bouhssini M.E., Gautam P., Poland J., Akci N., Demir L., Wanyera R., Baenziger P.S. (2019) Genome-wide association study for multiple biotic stress resistance in synthetic hexaploid wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3667.

- 89. Yao Y., Carretero-Paulet L., Van de Peer Y. (2019) Using digital organisms to study the evolutionary consequences of whole genome duplication and polyploidy. *PLoS One.* 14, e0220257.
- Keane O.M., Toft C., Carretero-Paulet L., Jones G.W., Fares M.A. (2014) Preservation of genetic and regulatory robustness in ancient gene duplicates of *Saccharomyces cerevisiae. Genome Res.* 24, 1830–1841.
- Carretero-Paulet L., Van de Peer Y. (2020) The evolutionary conundrum of whole-genome duplication. *Am. J. Bot.* 107, 1101–1105.
- Анацкая О.В., Виноградов А.Е., Кудрявцев Б.Н. (1998) Уровни плоидности миоцитов в разных отделах сердца птиц. *Цитология*. 5, 359–371.
- Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. (2004) Paradoxical relationship between protein content and nucleolar activity in mammalian cardiomyocytes. *Genome*. 47, 565–578.
- Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. (2004) Heart and liver as developmental bottlenecks of mammal design: evidence from cell polyploidization. *Biol. J. Linn. Soc.* 83, 175–186.
- 95. Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. (2002) Myocyte ploidy in heart chambers of birds with different locomotor activity. *J. Exp. Zool.* **293**, 427–441.
- Derks W., Bergmann O. (2020) Polyploidy in cardiomyocytes: roadblock to heart regeneration? *Circ. Res.* 126, 552–565.
- Brodsky V.Y., Sarkisov D.S., Arefyeva A.M., Panova N.W., Gvasava I.G. (1994) Polyploidy in cardiac myocytes of normal and hypertrophic human hearts; range of values. *Virchows Arch.* 424, 429–435.
- Leone M., Engel F.B. (2019) Advances in heart regeneration based on cardiomyocyte proliferation and regenerative potential of binucleated cardiomyocytes and polyploidization. *Clin. Sci. (Lond).* 133, 1229–1253.
- Anatskaya O.V., Sidorenko N.V., Beyer T.V., Vinogradov A.E. (2010) Neonatal cardiomyocyte ploidy reveals critical windows of heart development. *Int. J. Cardiol.* 141, 81–91.
- 100. Анацкая О.В., Сидоренко Н.В., Бейер Т.В., Виноградов А.Е. (2010) Неонатальный гастроэнтерит как причина долговременной атрофии, деформации и необратимой гиперполиплоидизации кардиомиоцитов. *Кардиология*. **10**(12), 35–44.
- Anatskaya O.V., Sidorenko N.V., Vinogradov A.E., Beyer T.V. (2007) Impact of neonatal cryptosporidial gastroenteritis on epigenetic programming of rat hepatocytes. *Cell Biol. Int.* 31, 420–427.
- 102. Anatskaya O.V., Sidorenko N.V., Matveev I.V., Kropotov A.V., Vinogradov A.E. (2012) Remodeling of rat cardiomyocytes after neonatal cryptosporidiosis. II. Deformation, excessive polyploidization, and HIF-1α overexpression. *Cell Tiss. Biol.* 6, 472–484.
- 103. Anatskaya O.V., Matveev I.V., Sidorenko N.V., Kharchenko M.V., Kropotov A.V., Vinogradov A.E. (2013) Changes in the heart of neonatal rats after cryp-

tosporidial gastroenteritis of different degrees of severity. J. Evol. Biochem. Phys. 49, 509–518.

- 104. Bensley J.G., Stacy V.K., De Matteo R., Harding R., Black M.J. (2010) Cardiac remodelling as a result of pre-term birth: implications for future cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* 31, 2058–2066.
- 105. Filatova N.A., Knyazev N.A., Skarlato S.O., Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. (2018) Natural killer cell activity irreversibly decreases after *Cryptosporidium* gastroenteritis in neonatal mice. *Parasite Immunol.* 40, e12524.
- 106. Mayfield-Jones D., Washburn J.D., Arias T., Edger P.P., Pires J.C., Conant G.C. (2013) Watching the grin fade: tracing the effects of polyploidy on different evolutionary time scales. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 320–331.
- Vinogradov A.E., Anatskaya O.V., Kudryavtsev B.N. (2001) Relationship of hepatocyte ploidy levels with body size and growth rate in mammals. *Genome.* 44, 350–360.
- Anatskaya O.V., Vinogradov A.E., Kudryavtsev B.N. (2001) Cardiomyocyte ploidy levels in birds with different growth rates. *J. Exp. Zool.* 289, 48–58.
- 109. Анацкая О.В., Эренпрейса Е.А., Никольский Н.Н., Виноградов А.Е. (2015) Попарно-перекрестное сравнение транскриптомов млекопитающих в исследовании влияния полиплоидии на активность экспрессии генных модулей развития. *Цитология*. 57, 899–908.
- Vinogradov A.E. (2005) Genome size and chromatin condensation in vertebrates. *Chromosoma*. 113, 362– 369.
- Pienta K.J., Hammarlund E.U., Axelrod R., Amend S.R., Brown J.S. (2020) Convergent evolution, evolving evolvability, and the origins of lethal cancer. *Mol. Cancer Res.* 18, 801–810.
- 112. Lopez-Sánchez L.M., Jimenez C., Valverde A., Hernandez V., Peñarando J., Martinez A., Lopez-Pedrera C., Muñoz-Castañeda J.R., De la Haba-Rodríguez J.R., Aranda E., Rodriguez-Ariza A. (2014) CoCl2, a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer. *PLoS One.* 9, e99143.
- 113. Mirzayans R., Murray D. (2020) Intratumor heterogeneity and therapy resistance: contributions of dormancy, apoptosis reversal (Anastasis) and cell fusion to disease recurrence. *IJMS*. **21**, 1308.
- 114. Mirzayans R., Andrais B., Murray D. (2018) Roles of polyploid/multinucleated giant cancer cells in metastasis and disease relapse following anticancer treatment. *Cancers (Basel)*. **10**, 118.
- 115. Amend S.R., Torga G., Lin K.-C., Kostecka L.G., de Marzo A., Austin R.H., Pienta K.J. (2019) Polyploid giant cancer cells: unrecognized actuators of tumorigenesis, metastasis, and resistance. *Prostate*. **79**, 1489–1497.
- 116. Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. (2010) Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammal transcriptome. *Funct. Integr. Genomics.* **10**, 433–446.

- 117. Vazquez-Martin A., Anatskaya O.V., Giuliani A., Erenpreisa J., Huang S., Salmina K., Inashkina I., Huna A., Nikolsky N.N., Vinogradov A.E. (2016) Somatic polyploidy is associated with the upregulation of c-MYC interacting genes and EMT-like signature. *Oncotarget.* 7, 75235–75260.
- Anatskaya O.V., Erenpreisa J., Giuliani A., Tsimokha A.S., Salmina K., Vinogradov A.E. (2020) Polyploidy related induction of morphogenetic signaling is mediated via proteasome pathway. *Cell Death Discov.* 6, RPC02.
- 119. Селенина А.В., Цимоха А.С., Томилин А.Н. (2017) Протеасомы в регуляции белкового гомеостаза плюрипотентных стволовых клеток. *Acta Naturae*. 9, 39–47.
- Lazzeri E., Angelotti M.L., Conte C., Anders H.-J., Romagnani P. (2019) Surviving acute organ failure: cell polyploidization and progenitor proliferation. *Trends Mol. Med.* 25, 366–381.
- Donne R., Saroul-Aïnama M., Cordier P., Celton-Morizur S., Desdouets C. (2020) Polyploidy in liver development, homeostasis and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 391–405.
- 122. Chikhirzhina E., Starkova T., Polyanichko A. (2018) The role of linker histones in chromatin structural organization. 1. H1 family histones. *Biophysics*. 63, 858– 865.
- Chikhirzhina E.V., Starkova T.Yu., Polyanichko A.M. (2020) The role of linker histones in chromatin structural organization. 2. Interaction with DNA and nuclear proteins. *Biophysics*. 65, 202–212.
- Chikhirzhina E., Starkova T., Beljajev A., Polyanichko A., Tomilin A. (2020) Functional diversity of nonhistone chromosomal protein HmgB1. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7948.
- 125. Старкова Т.Ю., Артамонова Т.О., Ермакова В.В., Чихиржина Е.В., Ходорковский М.А., Томилин А.Н. (2019) Профиль посттранскрипционных модификаций гистона Н1 в хроматине эмбриональных ставоловых клеток мыши. Acta Naturae.11, 82–91.
- 126. Gilsbach R., Preissl S., Grüning B.A., Schnick T., Burger L., Benes V., Würch A., Bönisch U., Günther S., Backofen R., Fleischmann B.K., Schübeler D., Hein L. (2014) Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. *Nat. Commun.* 5, 5288.
- 127. Silva I.S., Ghiraldini F.G., Veronezi G.M.B., Mello M.L.S. (2018) Polyploidy and nuclear phenotype characteristics of cardiomyocytes from diabetic adult and normoglycemic aged mice. *Acta Histochem.* **120**, 84–94.
- Bian F., Gao F., Kartashov A.V., Jegga A.G., Barski A., Das S.K. (2016) Polycomb repressive complex 1 controls uterine decidualization. *Sci. Rep.* 6, 26061.
- 129. Han P., Li W., Yang J., Shang C., Lin C.H., Cheng W., Hang C.T., Cheng H.L., Chen C.H., Wong J., Xiong Y., Zhao M., Drakos S.G., Ghetti A., Li D.Y., Bernstein D., Chen H.S., Quertermous T., Chang C.P.

(2016) Epigenetic response to environmental stress: assembly of BRG1-G9a/GLP-DNMT3 repressive chromatin complex on Myh6 promoter in pathologically stressed hearts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1863**, 1772–1781.

- 130. Bernstein B.E., Mikkelsen T.S., Xie X., Kamal M., Huebert D.J., Cuff J., Fry B., Meissner A., Wernig M., Plath K., Jaenisch R., Wagschal A., Feil R., Schreiber S.L., Lander E.S. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. **125**, 315–326.
- Malik A., Korol A., Weber M., Hankeln T., Avivi A., Band M. (2012) Transcriptome analysis of the spalax hypoxia survival response includes suppression of apoptosis and tight control of angiogenesis. *BMC Genomics.* 13, 615.
- 132. Ma S., Upneja A., Galecki A., Tsai Y.M., Burant C.F., Raskind S., Zhang Q., Zhang Z.D., Seluanov A., Gorbunova V., Clish C.B., Miller R.A., Gladyshev V.N. (2016) Cell culture-based profiling across mammals reveals DNA repair and metabolism as determinants of species longevity. *Elife*. 5, e19130.
- 133. Ma S., Gladyshev V.N. (2017) Molecular signatures of longevity: Insights from cross-species comparative studies. *Semin. Cell Dev. Biol.* **70**, 190–203.
- 134. Tsimokha A.S., Kulichkova V.A., Karpova E.V., Zaykova J.J., Aksenov N.D., Vasilishina A.A., Kropotov A.V., Antonov A., Barlev N.A. (2014) DNA damage modulates interactions between microRNAs and the 26S proteasome. *Oncotarget*. **5**, 3555–3567.
- Margulis B., Tsimokha A., Zubova S., Guzhova I. (2020) Molecular chaperones and proteolytic machineries regulate protein homeostasis in aging cells. *Cells*. 9, 1308.
- Blanc G., Wolfe K.H. (2004) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell.* 16, 1667–1678.
- 137. Fotiou E., Williams S., Martin-Geary A., Robertson D.L., Tenin G., Hentges K.E., Keavney B. (2019) Integration of large-scale genomic data sources with evolutionary history reveals novel genetic loci for congenital heart disease. *Circ. Genom. Precis. Med.* 12, 442–451.
- 138. Yamasaki M., Makino T., Khor S.S., Toyoda H., Miyagawa T., Liu X., Kuwabara H., Kano Y., Shimada T., Sugiyama T., Nishida H., Sugaya N., Tochigi M., Otowa T., Okazaki Y., Kaiya H., Kawamura Y., Miyashita A., Kuwano R., Kasai K., Tanii H., Sasaki T., Honda M., Tokunaga K. (2020) Sensitivity to gene dosage and gene expression affects genes with copy number variants observed among neuropsychiatric diseases. *BMC Med. Genomics.* 13, 55.
- Arbabian A., Iftinca M., Altier C., Singh P.P., Isambert H., Coscoy S. (2020) Mutations in calmodulinbinding domains of TRPV4/6 channels confer invasive properties to colon adenocarcinoma cells. Channels (Austin). 14, 101–109.
- Illidge T.M., Cragg M.S., Fringes B., Olive P., Erenpreisa J.A. (2000) Polyploid giant cells provide a sur-

vival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. *Cell Biol. Int.* **24**, 621–633.

- 141. Sundaram M., Guernsey D.L., Rajaraman M.M., Rajaraman R. (2004) Neosis: a novel type of cell division in cancer. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 207–218.
- 142. Puig P.-E., Guilly M.N., Bouchot A., Droin N., Cathelin D., Bouyer F., Favier L., Ghiringhelli F., Kroemer G., Solary E., Martin F., Chauffert B. (2008) Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy. *Cell Biol. Int.* 32, 1031–1043.
- 143. Lagadec C., Vlashi E., Della Donna L., Dekmezian C., Pajonk F. (2012) Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells: radiation-induced cancer stem cells. *Stem Cells*. **30**, 833–844.
- 144. Weihua Z., Lin Q., Ramoth A.J., Fan D., Fidler I.J. (2011) Formation of solid tumors by a single multinucleated cancer cell. *Cancer*. **117**, 4092–4099.
- 145. Sikora E., Czarnecka-Herok J., Bojko A., Sunderland P. (2020) Therapy-induced polyploidization and senescence: coincidence or interconnection? *Semin. Cancer Biol.* S1044-579X(20)30253-4. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.11.015
- Patterson M., Swift S.K. (2019) Residual diploidy in polyploid tissues: a cellular state with enhanced proliferative capacity for tissue regeneration? *Stem Cells Dev.* 28, 1527–1539.
- 147. Patterson M., Barske L., Van Handel B., Rau C.D., Gan P., Sharma A., Parikh S., Denholtz M., Huang Y., Yamaguchi Y., Shen H., Allayee H., Crump J.G., Force T.I., Lien C.L., Makita T., Lusis A.J., Kumar S.R., Sucov H.M. (2017) Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration. *Nat. Genet.* 49, 1346–1353.
- 148. Gan P., Patterson M., Velasquez A., Wang K., Tian D., Windle J.J., Tao G., Judge D.P., Makita T., Park T.J., Sucov H.M. (2019) Tnni3k alleles influence ventricular mononuclear diploid cardiomyocyte frequency. *PLoS Genet.* 15, e1008354.
- 149. Анацкая О.В., Рунов А.Л., Вонский М.С., Харченко М.В., Пономарцев С.В., Елмуратов А.У., Виноградов А.Е. (2019) Нарушение постнатального органогенеза сердца после неонатальной непереносимости лактозы. *Гены и клетки.* 14, 21–22.
- 150. Salman-Minkov A., Sabath N., Mayrose I. (2016) Whole-genome duplication as a key factor in crop domestication. *Nat. Plants.* 2, 16115.
- 151. Guo H., Mendrikahy J.N., Xie L., Deng J., Lu Z., Wu J., Li X., Shahid M.Q., Liu X. (2017) Transcriptome analysis of neo-tetraploid rice reveals specific differential gene expressions associated with fertility and heterosis. *Sci. Rep.* 7, 40139.
- 152. Julião S.A., Ribeiro C.D.V., Lopes J.M.L., de Matos E.M., Reis A.C., Peixoto P.H.P., Machado M.A., Azevedo A.L.S., Grazul R.M., de Campos J.M.S., Viccini L.F. (2020) Induction of synthetic polyploids and assessment of genomic stability in *Lippia alba*. *Front. Plant Sci.* 11, 292.

942

- 153. Vinogradov A.E., Borkin L.J., Günther R., Rosanov J.M. (1991) Two germ cell lineages with genomes of different species in one and the same animal. *Hereditas.* **114**, 245–251.
- 154. Vinogradov A.E., Borkin L.J., Günther R., Rosanov J.M. (1990) Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males: cytological evidence from DNA flow cytometry. *Genome.* 33, 619–627.

WHOLE-GENOME DUPLICATION IN EVOLUTION, ONTOGENESIS AND PATHOLOGY: COMPLEXITY AND EMERGENCY RESERVE

O. V. Anatskaya^{1, *} and A. E. Vinogradov¹

¹Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia *e-mail: olga.anatskaya@gmail.com

Whole-genome duplication (WGD), or polyploidy increases the amount of genetic information in a cell. WGD of whole organisms are found in all branches of eukaryotes and are the driving force behind speciation, complication, and adaptations. In somatic cells, WGD are found in all types of tissues and can result from normal and altered ontogenetic programs, regeneration, pathological conditions, aging, malignancy, and metastasis. Despite the versatility of WGD, their functional significance, general properties, and reasons for increased adaptability are not clear. Comparison of full transcriptome data and information from different fields of molecular biology, genomics, and molecular medicine showed that both polyploidy of organisms and somatic and cancer cells is associated with a number of common features that make it possible to understand which properties of WGD lead to the emergence of an adaptive phenotype. The adaptability of WGD may be associated with an increase in the complexity of the regulation of networks and signaling systems, resistance to stress, activation of ancient evolutionary programs of unicellularity, pathways of morphogenesis, survival, and life extension. As a result of stress, a shift in the balance between the cellular and organismal levels of control of gene regulation towards the priority of cell survival is possible, which can lead to cardiovascular diseases and carcinogenesis. The presented information helps to understand how polyploidy creates new phenotypes and why it is a driving force of evolution and an important regulator of biological processes in somatic cells, ontogenesis, pathogenesis, regeneration, and transformation.

Keywords: polyploidy, evolution, regeneration, carcinogenesis, aging, regulation complexity, stress resistance

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 57.083.18

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОТ-ПЦР С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ПРАЙМЕРАМИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННОЙ ПНЕВМОНИИ ЧЕЛОВЕКА

© 2021 г. С. А. Лапа^{*a*, *}, Р. А. Мифтахов^{*a*}, Е. С. Клочихина^{*a*}, Ю. И. Аммур^{*b*}, С. А. Благодатских^{*c*}, В. Е. Шершов^{*a*}, А. С. Заседателев^{*a*}, А. В. Чудинов^{*a*}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия ^bНаучно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия ^cНаучный иентр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, 142279 Россия

> *e-mail: lapa@biochip.ru Поступила в редакцию 12.03.2021 г. После доработки 12.04.2021 г. Принята к публикации 13.04.2021 г.

Разработан прототип системы, основанной на мультиплексной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в иммобилизованной фазе, для выявления возбудителей инфекционной пневмонии человека. Сконструированы праймеры для идентификации ДНК шести видов бактерий и PHK двух вирусов: гриппа A и SARS-CoV-2. Накопление сигнала удлиняющихся иммобилизованных праймеров обусловлено включением в растущую цепь флуоресцентно меченных нуклеотидов. Детекция сигнала происходит после удаления всех компонентов смеси, что существенно снижает фон и увеличивает чувствительность анализа. Применение специализированного детектора позволяет считывать сигналы удлиненных праймеров непосредственно через прозрачную покровную пленку реакционной камеры. Такое решение призвано предотвратить перекрестную контаминацию и подходит для одновременного тестирования большого количества образцов. Предлагаемая платформа способна выявлять несколько различных возбудителей пневмонии в одном образце; она имеет открытую архитектуру, что позволяет расширять спектр определяемых патогенных бактерий и вирусов.

Ключевые слова: ОТ-ПЦР в иммобилизованной фазе, мультиплексная ПЦР, инфекционная пневмония, грипп, SARS-CoV-2

DOI: 10.31857/S0026898421050062

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционная пневмония – острый воспалительный процесс легочной ткани, вызываемый возбудителями бактериальной, вирусной и грибковой природы: стрептококками, стафилококками, вирусами гриппа, коронавирусами и другими (наиболее распространенные возбудители пневмонии подробно рассмотрены в обзорах [1–5]).

Вирусные и бактериальные пневмонии часто имеют сходную клиническую картину. Этиологию пневмоний, вызванных коронавирусами и вирусами гриппа, не всегда удается определить своевременно в условиях клинической лаборатории, что приводит к ошибкам в выборе стратегии лечения пациента. В период эпидемий ситуацию усугубляет распространение внутрибольничных бактериальных инфекций (коинфекций) в условиях массового заражения [6, 7], поэтому ускоренное дифференциальное определение возбудителя представляет важную задачу, от решения которой зависит быстрая и точная постановка диагноза и, следовательно, проведение своевременной и корректной терапии [8].

На сегодняшний день в условиях клинической лаборатории возбудителей инфекций идентифицируют с использованием культуральных методов [9], а также тест-систем, основанных на ПЦР или серологических тестах, которые в большинстве случаев ориентированы на определение одного вида возбудителя [10, 11]. Часто постановка диагноза и назначение терапии основаны только на клинической картине заболевания [12] либо дополняются данными радиологических методов [13, 14].

Мультиплексная ПЦР считается перспективным инструментом молекулярно-биологических исследований и клинической диагностики. Применение мультиплексной ПЦР для одновременного выявления нескольких возбудителей пневмонии человека в одном образце крайне важно, учитывая сложность определения этиологии заболевания классическими клиническими методами, в том числе идентификации возбудителей респираторных инфекций [15–17]. В клинических лабораториях РНК-содержащие вирусы выявляют с использованием обратной транскрипции (ОТ) [18, 19].

ОТ в мультиплексном варианте применяют для обнаружения РНК-содержащих вирусов – возбудителей респираторных инфекций [20–23]. Мультиплексный вариант ОТ-ПЦР используют для одновременного выявления РНК- и ДНК-содержащих вирусов [24]. Описано одновременное обнаружение вироидов (РНК) и эубактерий (ДНК) с помощью методики, сочетающей ОТ и ПЦР [25]. ОТ-ПЦР с последующим гибридизационным анализом на биологическом микрочипе рассмотрена в [26, 27].

Проведение мультиплексной ОТ-ПЦР на биологическом микрочипе способно повысить производительность, чувствительность и надежность множественного выявления нуклеиновых кислот бактериальных и вирусных инфекционных агентов в образце. Этот метод хорошо сочетается с масштабами тестирования, проводимого клиническими лабораториями.

В настоящей работе предложен ускоренный способ определения возбудителя в образце с применением метода мультиплексной ОТ-ПЦР в иммобилизованной фазе. Этот способ обладает высокой скоростью проведения анализа при одновременном обнаружении ряда патогенных агентов. Прототип разработанной диагностической системы устойчив к перекрестной контаминации, совместим со стандартными *in situ* амплификаторами, а также с детекторами флуоресцентного сигнала, разработанными для биологических микрочипов. Прототип обладает открытой архитектурой, благодаря чему возможно расширение спектра выявляемых патогенных агентов при выполнении условия совместимости многопраймерной системы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. В работе использовали деконтаминированные полногеномные ДНК штаммов бактерий из коллекции ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск) и вирусную РНК из коллекции Института вакцин и сывороток (Москва). Работы с клиническими изолятами и живыми культурами проводили на базе указанных учреждений.

ДНК из культур выделяли с использованием СТАВ-метода [28]. Суспензию бактериальной культуры готовили в 1× ТЕ-буфере. Клетки лизировали с использованием раствор лизоцима (10 мг/мл). Для разрушения белков и отделения белков от ДНК использовали протеиназу К ("Thermo Fisher", США) и раствор СТАВ/NaCl. Белки, клеточные элементы, ДНК разделяли с использованием раствора хлороформ/изоамиловый спирт в соотношении 24 : 1. ДНК отделяли от остальной части раствора с помощью изопропилового спирта и отмывали от остатков реактивов 70%-ным раствором этанола (х.ч.). Отмытую и высушенную ДНК растворяли в дистиллированной воде.

Качество и количество ДНК определяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле и спектрофотометрически (GeneQuant Pro RNA/DNA Calculator, "Amersham Pharmacia Biotech", Великобритания).

Получены деконтаминированные ДНК следующих штаммов: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Legionella pneumophila* ATCC 33152, *Pseudomonas aeruginosa* 10662 NCTC ATCC 25668, *Klebsiella pneumoniae* 9633 NCTC ATCC 13883, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Вирус SARS-CoV-2 получен путем наработки в культуре клеток Vero (АТСС, США) вирусных частиц из клинического образца, полученного от больного COVID-19. Присутствие РНК SARS-CoV-2 в вирусном материале анализировали методом ОТ-ПЦР в реальном времени с праймерами к гену N [29]. Таксономическая приналлежность изолята к виду Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV-2, клада GH) установлена путем секвенирования гена S (идентификационный номер GenBank MW161041.1) и полного генома (идентификационный номер Gen-Bank MW514307.1) с последующим филогенетическим анализом. Послеловательность гена S штамма Dubrovka имела 99.2%-ное сходство со штаммом Wuhan-Hu-1 (NC_045512.20). Особенность штамма Dubrovka – делеция 27 нуклеотидов в гене S (кодируют 9 аминокислотных остатков в положении 68-76 S-белка – YMSLGPMVL), которая объясняет относительно высокий уровень различий (0.8%) между этими штаммами.

Вирусы гриппа A (штамм A/Panama/2007/99 H3N2) и B (B/Leningrad/179/86) получены из Коллекции микроорганизмов III и IV групп патогенности НИИВС им И.И. Мечникова.

Вирусный материал инактивировали в лизирующем растворе (набор для выделения РНК "Магно-Сорб", Россия), содержащем хаотропный агент — гуанидинизотиоцианат. Инактивацию вируса SARS-CoV-2 проверяли по наличию или отсутствию цитопатического эффекта на чувствительной культуре клеток Vero.

Вирусную геномную РНК выделяли из 140 мкл лизата, используя коммерческий набор QIAamp Viral RNA Mini Kit ("Qiagen", Германия) согласно инструкции производителя. В первом случае очищенную вирусную РНК элюировали с мембраны колонок QIAamp Mini Spin 60 мкл воды, не содержащей РНКаз, и хранили при температуре –70°С до использования.

Вирусную РНК экстрагировали также с использованием СТАВ-метода (в модифицированном варианте), который требуется оптимизировать, чтобы применять одновременно как для РНК-, так и для ДНК-содержащих патогенных агентов.

Праймеры. Нуклеотидные последовательности геномных мишеней выравнивали с помощью алгоритма ClustalW (www.clustal.org). Праймеры конструировали с использованием сетевого ресурса www.idtdna.com. Определяли физико-химические характеристики каждого праймера, включая тестирование на присутствие как внутри- так и межмолекулярных вторичных структур. Специфичность анализировали с помощью алгоритма BLAST (NIH, США).

Мультиплексная ПЦР в объеме. Реакционная смесь (30 мкл) содержала 1.5 ед. Тад-полимеразы ("Thermo Scientific", США) в буфере той же фирмы, природные дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP), кажлый в концентрации 200 мкМ, праймеры в концентрации 5 мкМ и полногеномную бактериальную матрицу (либо смесь бактериальных ДНК). Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе MiniCycler ("MJResearch", США). Температурно-временной профиль ПЦР состоял из предварительной денатурации при 95°С в течение 5 мин, за которой следовали 30 циклов: 95°С (денатурация ДНК) в течение 20 с; 66°С (отжиг праймеров) в течение 30 с; 72°С (достройка праймеров) в течение 30 с и завершающая инкубация при 72°С в течение 5 мин.

Градиентную ПЦР и определение чувствительности системы с помощью ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе IQ5 ("Bio-Rad").

Горизонтальный электрофорез для контроля продуктов ОТ, и ПЦР. Продукты ПЦР разделяли в 4%-ном агарозном геле (Agarose LE, "Helicon", Россия), для окрашивания использовали бромистый этидий.

Иммобилизация праймеров, биологические микрочипы. Праймеры после синтеза и очистки растворяли в воде (Milli Q), концентрацию доводили до 8 мМ, смешивали с компонентами геля и наносили на чип, представляющий собой обработанное силикатное стекло либо полимерную подложку. Дальнейшую обработку подложки и процедуры изготовления чипа проводили согласно [30].

Мультиплексная ОТ-ПЦР в иммобилизованной фазе. ОТ-ПЦР проводили с использованием обратной транскриптазы MMLV и других компонентов набора "PEBEPTA-L" (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) и Hot Start Taq-полимеразы ("Thermo Scientific") в соответствующем буфере, либо с помощью набора OneStep RT-PCR Kit ("Qiagen"). Смесь содержала природные dNTP (по 400 мкМ каждого) и праймеры – 5–10 мкМ прямого и 0.5–1.0 мкМ обратного (различались для разных пар праймеров в результате оптимизации). В качестве флуоресцентного субстрата полимеразы использовали Су5-dUTP [31] в концентрации 8 мкМ. Смесь помещали на чип и герметизировали с помощью Frame-Seal 25 mkl ("Bio-Rad", США). Реакции проводили на ДНК-амплификаторе для in situ ПЦР TGradient Thermocycler ("Biometra", США). ОТ проводили в течение 30 мин при 42°С, после чего проводили ПЦР в следующих условиях: 95°С в течение 3 мин (начальная денатурация); 36 циклов по 20 с при 95°С, 30 с при 64°С и 40 с при 72°С; завершающая инкубация в течение 5 мин при 72°С.

Чувствительность ОТ-ПЦР на чипе определяли раститровкой ДНК/РНК анализируемых образцов в интервале 10^1-10^5 копий на реакционный объем (25 мкл).

Определение удлинения иммобилизованных праймеров, интерпретация результатов анализа. Считывание флуоресцентного сигнала с чипа после удлинения иммобилизованных праймеров осуществляли согласно схеме [32] с применением анализатора "Чип-детектор" (ИМБ, Россия). Интенсивность сигналов определяли с помощью программного обеспечения "ImaGeWare" ver. 3.50 (ИМБ, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ранее мы сообщали о разработке мультиплексной ПЦР для определения видов бактерий — возбудителей пневмонии человека [17, 33]. В дальнейшем на основе сконструированных праймеров, специфичных к *S. aureus* и *St. pneumoniae*, разработали мультиплексную ПЦР на чипе с включением метки в ДНК в процессе ее удлинения. Флуоресцентная метка, ковалентно встроенная в последовательность иммобилизованного праймера в процессе ПЦР, позволяла проводить "жесткую" отмывку чипа без риска потери сигнала и, соответственно, без снижения чувствительности системы [32].

В нашей работе расширен набор специфичных праймеров. Теперь он охватывает шесть основных видов бактерий, возбудителей пневмонии, а также два PHK-содержащих вируса: вирус гриппа A и коронавирус нового типа, вызывающий COVID-19 (табл. 1), что привело к использованию ОТ. В качестве необходимых условий при конструировании праймеров учитывали специфичность и внутривидовую консервативность выбранных участков генетических мишеней. Для удобства идентификации возбудителя на стадии оптимизации многопраймерной системы "в общем объеме" конструировали пары праймеров, позволяющих получить ПЦР-продукты различной длины. При конструировании мультиплексной ПШР руковолствовались требованием совместимости праймеров, т.е. отсутствия межмолекулярных взаимодействий для всех праймеров системы, а также стандартными требованиями близких температур плавления дуплексов и отсутствия внутримолекулярных взаимолействий (шпилек). BLAST-анализ проводили, выбирая видоспецифичные консервативные участки геновмишеней. используемых для видовой идентификации патогенных микроорганизмов и вирусов. В табл. 1 указаны последовательности. фланкирующие выбранные регионы, а также длины получаемых ПЦР-продуктов. Для создания микрочипа иммобилизовали либо обратный праймер в каждой паре, либо так называемый "вложенный" праймер, лежащий внутри амплифицируемого региона. фланкируемого прямым и обратным праймерами. Выбор определялся сравнительным тестированием праймеров при оптимизации системы. В табл. 1 приведены результирующие праймеры. полученные после оптимизации системы.

Важное условие видоспецифичной идентификации патогенных агентов — внутривидовая консервативность выбранных мишеней. В идеале это должны быть гены, кодирующие белки, характерные только для исследуемых микроорганизмов или вирусов, либо гены, последовательности которых резко отличаются от последовательностей гомологичных генов родственных видов, непатогенных для человека. При этом предпочтительно использовать гены, кодирующие факторы патогенности. Так, большинство отобранных мишеней определяют вирулентность идентифицируемых патогенных агентов.

В табл. 1 приведены генетические мишени, использованные для идентификации патогенов. Мишени выбирали на основании доказанной возможности их применения для видовой идентификации соответствующего возбудителя.

Ген *lytA St. pneumoniae* кодирует один из факторов вирулентности — аутолизин, участвующий в ряде клеточных процессов [34]; ген *cpsB* (тирозин-специфичная протеинфосфатаза В) стрептококка участвует в регуляции биосинтеза капсульных полисахаридов [35]. Ген *ebpS* (эластинсвязывающий белок S) относится к группе генов *S. aureus*, которые кодируют белки, участвующие в связывании молекул на поверхности клеток [36]. Ген *fucK*, применяемый для видовой идентификации *H. influenzae* [37], относится к генам углеводного обмена. Ген *oprL* кодирует пептидогликан-ассо-

Возбудитель	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Длина, нуклеотиды	Длина ПЦР- продукта, п.н.
Streptococcus pneumoniae	lytA-f1	5'-ATTGACGAATTGCTCTTGTCTCA-3'	23	204
	lytA-r1	5'-AAGTTTACGCATGGCCTGGCTCA-3'	23	
	cpsB-f1	5'-TTGATGTAGATGACGGTCCCAAG-3'	23	217
	cpsB-r1	5'-TATATCTCTGCGCCATAAGCAAT-3'	23	
Staphylococcus aureus	ebpS-f1	5'-ACTCGACTGAGGATAAAGCGTCT-3'	23	- 283
	ebpS-r1	5'-CCTCCAAATATCGCTAATGCACC-3'	23	
Haemophilus influenzae	fucK-f1	5'-TGCTCACTCAACGCTTAACTGGT-3'	23	- 193
	fucK-r1	5'-TTCTGGGCTAATGGTGTACGTAA-3'	23	
Pseudomonas aeruginosa	oprL-fl	5'-GCGTGCGATCACCACCTTCTACT-3'	23	321
	oprL-r1	5'-TTCTTCAGCTCGACGCGACGGTT-3'	23	
Legionella pneumophila	sidA-f1	5'-TTCCACTGGTGGGTGGGTTTTG-3'	22	370
	sidA-r1	5'-TCATGTTGGAGTTCTATGGCACG-3'	23	
Klebsiella pneumoniae	rmpA-f2	5'-GGACTACCTCTGTTTCATATTAC-3'	23	373
	rmpA-r2	5'-CCCCATTTTTCAGTAGGCAT-3'	20	
SARS-CoV-2	E-forw	5'-TCGTTTCGGAAGAGACAGGTACG-3'	23	143
	E-rev	5'-AAGACTCACGTTAACAATATTGC-3'	23	
Вирус гриппа А	M2-forw	5'-CACGCTCACCGTGCCCAGTGAGCG-3'	24	203
	M2-rev	5'-TATATGAGGCCCATGCAACTGGCA-3'	24	

Таблица 1. Праймеры для видоспецифичного определения бактериальных и вирусных возбудителей пневмонии человека



Рис. 1. Схема анализа с применением иммобилизованных праймеров. Литерами f и г обозначены прямой и обратный фланкирующие праймеры, литерами r1 и r2 — вложенные иммобилизованные праймеры (содержат аминогруппы на 5'-конце), dU* — меченный цианиновым красителем дезоксиуридин, встраиваемый в процессе удлинения праймера.

циированный белок, который участвует в инвагинации мембраны во время деления клеток псевдомонад, в частности *P. aeruginosa*. Этот ген важен для поддержания целостности мембраны [38]. Для видовой идентификации *L. pneumophila* и *K. pneumoniae* используют детерминанты вирулентности этих бактерий – SidA и RmpA, соответственно, [39, 40].

В случае РНК-содержащих вирусов: SARS-CoV-2 и вируса гриппа А использовали ген *E* (кодирует белок оболочки (envelope protein) [41]) и сегмент 7 матриксного белка 2 (M2) [42] соответственно.

Строили множественные выравнивания последовательностей каждого выбранного региона из архива NIH (США) и проводили поиск консервативных участков для конструирования фланкирующих праймеров. В случае РНК-содержащих вирусов, обладающих высокой вариабельностью, использовали вырожденные нуклеотидные позиции. Теоретическую специфичность праймеров проверяли с помощью алгоритма BLAST (NIH, США).

При разработке систем с открытой архитектурой большое значение приобретает совместимость всего пула праймеров. Под совместимостью понимается отсутствие каких-либо комплементарных взаимодействий всего набора праймеров. Расширение системы приводит к необходимости проверки отсутствия такого рода взаимодействий вновь вводимых праймеров с уже оптимизированной системой. Проведение таких процедур возможно даже в ручном режиме.

На стадии оптимизации полезно проводить тестирование праймеров с помощью ПЦР в одном объеме с последующим электрофоретическим разделением продуктов реакции. Кроме того, иммобилизованные в различных ячейках праймеры лишены возможности взаимодействия между собой, что несколько облегчает задачу. На рис. 1 представлена принципиальная схема выявления одной генетической мишени с применением иммобилизованных праймеров.

Система сконструирована так, что для каждого возбудителя на чипе присутствует несколько специфичных праймеров. Иногда иммобилизовали обратный фланкирующий праймер "r", в ряде случаев — вложенные праймеры (на схеме "r1" и "r2"), выбираемые по результатам предварительной оптимизации (тестирования в общем объеме). И так для каждого возбудителя.

На начальном этапе процесса оптимизации мультиплексной системы в общем объеме тестировали несколько специфичных праймеров для каждого региона. Соответствующие электрофоре-граммы представлены на рис. 2.

Из рис. 2 видно, что длины ПЦР-продуктов в каждой из лунок геля соответствуют теоретически ожидаемым. Однако видны четкие различия в выходе продукта, его однородности (в ряде случаев видны побочные продукты) либо эффект "primerdimer", что наблюдается, например, в лунке *10* (рис. 26). Эти эффекты устранили в процессе оптимизации системы.

В случае РНК-содержащих вирусов первый этап оптимизации включал стадию ОТ. На рис. 3 показан результат проведения ОТ-ПЦР РНК SARS-CoV-2 и вируса гриппа А.

После первой стадии следовала оптимизация системы с применением всех выбранных пар праймеров, в том числе, с применением градиентной ПЦР и варьированием концентрации компонентов системы, включая праймеры.

Определяли чувствительность и специфичность сконструированной тест-системы, в том числе, при попарном использовании анализируемых мишеней на одном биологическом микрочипе. По результатам экспериментов заменяли некоторые иммобилизованные праймеры, а также свободные фланкирующие праймеры в реакционной смеси.



Рис. 2. Экспериментальный выбор специфичных праймеров при оптимизации системы по результатам анализа продуктов ПЦР. *a*: *1* – маркер длин фрагментов дцДНК DNA Ladder 50 bp (жирным полосам маркера соответствуют длины 250 и 500 п.н. дцДНК); *2* – **F1** + **R1** (163 п.н.); *3* – **F2** + **R1** (78 п.н.); *4* – **F3** + **R1** (180 п.н.); *5* – **F1** + **R2** (115 п.н.); *6* – **F2** + **R2** (30 п.н.); *7* – **F3** + **R2** (132 п.н.). *6*: *1* – Ladder 50 bp; *2* – **F4** + **R3** (144 п.н.); *3* – **F5** + **R3** (131 п.н.); *4* – **F6** + **R3** (169 п.н.); *5* – **F4** + **R4** (87 п.н.); *6* – **F5** + **R4** (74 п.н.); *7* – **F6** + **R4** (112 п.н.); *8* – **F4** + **R5** (126 п.н.); *9* – **F5** + **R5** (113 п.н.); *10* – **F6** + **R5** (151 п.н.).

Система показала более высокие отношения сигнал—фон по сравнению с использованием меченого праймера в растворе и определением удлинения праймера гибридизацией после проведения ПЦР. Преимущества предлагаемого подхода и схема анализа приведены в [32].

Температурно-временной профиль реакции оптимизировали с применением градиентной ПЦР; оптимизировали концентрации каждого реагента смеси, за исключением компонентов реакционного буфера, который использовали в соответствии с рекомендациями производителя. Специфичность праймеров к мишеням определяли для каждой пары праймеров и соответствующей им мишени, затем для той же пары праймеров – с другими мишенями (для исключения ложноспецифического взаимодействия), и лишь после этого тестировали мультипраймерную систему. В эксперименте использовали полноразмерные препараты бактериальной геномной ДНК, а также выделенную и очищенную РНК SARS-CoV-2 и вируса гриппа А.

После оптимизации многопраймерной системы в режиме ПЦР проводили тестирование и оптимизацию в режиме ОТ-ПЦР, что потребовало замены некоторых праймеров.

Праймеры для иммобилизации подвергали той же многостадийной процедуре тестирования, после чего осуществляли иммобилизацию и проверку их работы в различных режимах, подобно описанному для фланкирующих праймеров. Тестирование проводили на деконтаминированных образцах выделенной геномной ДНК/РНК.

Результирующие последовательности иммобилизованных праймеров, выбранные после оптимизации системы, приведены в табл. 2.

Схема специализированного биологического микрочипа и примеры анализа образцов представлены на рис. 4.

В системе предусмотрены два внутренних контроля – для стадии ОТ и стадии ПЦР. Чувствительность системы определяли раститровкой каждого из анализируемых образцов ДНК/РНК. В зависимости от мишени чувствительность системы с иммобилизованными праймерами составила от 10² до 10⁴ копий нуклеиновой кислоты на образец (только для имеющихся в коллекции образцов; статистических данных в настоящее время недостаточно). Увеличению чувствительности способствовало включение метки в растущую цепь иммобилизованного праймера. Такое решение позволяет осуществить ковалентную пришивку метки и удалить все компоненты смеси, которые увеличивают фоновый шум и за счет этого уменьшают чувствительность системы. Предлагаемый подход более подробно описан в недавней работе [32]; он представляет собой усовершенствование классической методологии применения ферментативных реакций на гидрогелевых чипах,



F7 5'-TCG TTT CGG AAG AGA CAG GTA CG-3' R6 5'-AAG ACT CAC GTT AAC AAT ATT GC-3' F8 5'-CACGCTCACCGTGCCCAGTGAGCG-3'
F9 5'-CTCACCGTGCCCAGTGAGCGAGG-3'
R7 5'-TATATGAGGCCCATGCAACTGGCA-3'
R8 5'-GGCATT(C/T)TGGACAAA(G/T)CGTCT-3'

Рис. 3. ОТ-ПЦР-анализ РНК коронавируса типа 2 и вируса гриппа А, выделенной из клинического образца. *а*: 1 -маркер длин фрагментов дцДНК GeneRuler 50 bp (жирным полосам маркера соответствуют длины 250 и 500 п.н. дцДНК); 2 -F7 + R6, количество исходной РНК 10³ копий на реакционную пробирку; 3 -F7 + R6, количество исходной РНК 10³ копий на реакционную пробирку; 3 -F7 + R6, количество исходной РНК 10⁴ копий на реакционную пробирку; 4 - отрицательный контроль (видны праймеры). Использованы праймеры E-f и E-r, теоретическая длина продукта 143 п.н. соответствует наблюдаемой на электрофореграмме. $\delta -$ Раздельное проведение ОТ и ПЦР при оптимизации (тестирование с помощью ОТ как прямого, так и обратного праймеров). 1 - Маркер длин продуктов ДНК GeneRuler 50 bp; 2 - OT F8, ПЦР F8 + R7; 3 - OT R7, ПЦР F8 + R7; 4 - OT F8, ПЦР F9 + R7; 5 - OT R7, ПЦР F9 + R8. Праймер R8 – экспериментальный, модифицированный (с введением вырожденных позиций) на основании предлагаемого WHO [42], остальные праймеры сконструированы специально для создания предлагаемой тест-системы.

Возбудитель	Праймер	Нуклеотидная последовательность праймера	Длина, нуклеотиды	Длина ПЦР- продукта, п.н.*
Streptococcus pneumoniae	R3	5'-NH ₂ -TATATCTCTGCGCCATAAGCAAT-3'	23	_
	R5	5'-NH ₂ -GCAATGACTAAATCATCTGCCAC-3'	23	_
Staphylococcus aureus	R1	5'-NH ₂ -CCTCCAAATATCGCTAATGCACC-3'	23	
	R2	5'-NH ₂ -GGTAACAATACTTTGGCCATGCCACC-3'	26	_
Haemophilus influenzae	R8	5'-NH ₂ -TTCACCTGCATAACGCATAGGAG-3'	23	_
	R9	5'-NH ₂ -CATAACGCATAGGAGGGAAATGG-3	23	_
Pseudomonas aeruginosa	R10	5'-NH ₂ -GTAGCGACCGGACGCTCTTTAC-3'	22	_
	R11	5'-NH ₂ -GCTCTTTACCATAGGAAACCAG-3'	22	_
Legionella pneumophila	R6	5'-NH ₂ -TCATTATATTTATCATTGTTTGGCTC-3'	26	_
	R7	5'-NH ₂ -ACGTTTCGCTACAAGATCTATAA-3'	23	_
Klebsiella pneumoniae	R13	5'-NH ₂ -GGCGTCAGATACAGGACGGCT-3'	21	_
	R14	5'- NH ₂ -CCACTCCACCGGCAGTGCTCAC-3'	22	_
SARS-CoV-2	E-f-n	5'-NH ₂ -CTTGCTTTCGTGGTATTCTTGCT-3'	23	_
	E-r-n	5'-NH ₂ -CACACAATCGAAGCGCAGTAAGG-3'	23	—
Вирус гриппа А	INF-F1	5'-NH ₂ -CTCACCGTGCCCAGTGAGCGAGG-3'	23	—

Таблица 2. Иммобилизованные праймеры для ОТ-ПЦР на биочипе

* Зависит от используемого прямого праймера (см. рис. 1).



Рис. 4. Специализированный биологический микрочип для видового определения возбудителей пневмонии методом мультиплексной ОТ-ПЦР. a — Схема: М — флуоресцентный маркер для автоматического наложения сетки при программном обеспечении расчета интенсивности сигнала ячеек; Gel — ячейка пустого геля; Sta — *Staphylococcus aureus* (здесь и во всех последующих случаях цифры "1" и "2" обозначают использование двух различных праймеров внутри последовательности, фланкируемой краевыми праймерами, литера "а" обозначает использование праймеров внутри последовательности, фланкируемой краевыми праймерами, литера "а" обозначает использование праймеров внутри последовательности, фланкируемой краевыми праймерами, литера "а" обозначает использование праймера в концентрации в 2 раза меньшей, чем в ячейке чипа без литеры — это необходимо для повышения надежности автоматического анализа); Str — *Streptococcus pneumoniae*, Leg — *Legionella pneumophila*, Hae — *Haemophilus influenzae*, Pse — *Pseudomonas aeruginosa*, Kle — *Klebsiella pneumoniae*, Cov — SARS-CoV-2, Inf — вирус гриппа A; Conl — внутренний контроль ПЦР. *б*-*e* — результаты определения вида (примеры) соответственно: *St. aureus*, *S. pneumoniae*, H. *influenzae*, SARS-CoV-2, вирус гриппа А. Для удобства приведены фото с инвертированными сигналами (негативы).

где используется меченый праймер, находящийся в растворе.

Система может быть расширена для анализа более широкого спектра возбудителей путем добавления иммобилизованных праймеров при условии контроля их совместимости с разработанной мультиплексной ОТ-ПЦР.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первая работа, описывающая проведение ПЦР на гидрогелевых биочипах, была опубликована в 2000 г. [43] научной группой ИМБ РАН (Россия). Вскоре ПЦР применили для выявления рифампицин-устойчивых штаммов возбудителя туберкулеза [44, 45], модификации метода ПЦР на чипе посвящена методическая работа [46].

Предложены оригинальные подходы к проведению ферментативных реакций в иммобилизованной фазе для создания компактных специализированных биочипов [47, 48], которые получили развитие в технике изотермической амплификации, "бридж-ПЦР" и, в конечном счете, в секвенировании нового поколения (NGS). Технические сложности проведения ПЦР на чипе по сравнению с гибридизационным анализом привели к тому, что в настоящее время "золотым стандартом" диагностических систем, основанных на технологии специализированных гидрогелевых биочипов, стало применение гибридизационного анализа [49–53]. На основе этого подхода создан ряд сертифицированных систем для клинической диагностики ("ТБ-Биочип", "СИ-Биочип" и другие).

В большинстве методов, основанных на ОТ, реакцию проводят в жидкой фазе (без использования биочипов) и лишь последующая гибридизация выполняется на чипе [26, 27].

Классическая схема детекции сигнала после проведения ферментативной реакции на биочипе предусматривает гибридизацию флуоресцентно меченного праймера на удлиненный иммобилизованный праймер. Эта схема делает невозможным проведение реакции в режиме реального времени, она весьма чувствительна к условиям детекции, так как представляет собой квазиравновесную систему; при этом повышен риск "смывания" гибридизованного праймера. Другой недостаток — повышенный фон и сравнительно низкое соотношение сигналов совершенных и несовершенных дуплексов из-за необходимости использования флуоресцентно меченных праймеров.

Одно из усовершенствований предлагаемого в настоящей работе подхода состоит во включении меченых нуклеотидов в растущую иммобилизованную цепь ДНК, что позволяет полностью удалить все компоненты реакционной смеси и тем самым резко снизить фоновый сигнал. При сочетании этого подхода с технологией "микрофлюидики" можно заменять растворы после каждого цикла амплификации и проводить реакции в режиме реального времени. Сочетание ОТ с ПЦР позволяет анализировать как РНК-, так и ДНК-содержащие патогенные агенты (вирусы и бактерии).

Различия в химической природе нуклеиновых кислот затрудняют разработку универсального метода экстракции (в частности, для получения максимального выхода выделяемой нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) используют различные соотношения хлороформ-изоамиловый спирт: в случае РНК необходимо использовать буферные растворы, обработанные диэтилпирокарбонатом и т.п.). Для создания универсального метода обнаружения РНК- и ДНК-содержащих патогенных агентов необходима унификация метода выделения нуклеиновых кислот. Мы использовали СТАВ-метод как один из наиболее бережных методов выделения суммарных ДНК и РНК из образцов, содержащих как бактериальные и эукариотические клетки, так и вирусные частицы [54, 55].

Масштабирование предлагаемой системы затрудняют различия в природе тестируемых образцов, присутствие ингибиторов, загрязнений, микроорганизмов-спутников. Присутствие в экстракте тотальной ДНК и РНК может усложнить анализ и требует более тщательного подхода к конструированию видоспецифичных праймеров.

Дальнейшее усовершенствование прототипа предлагаемой системы предполагает проведение статистического анализа, а также определение чувствительности и специфичности анализа с применением широкого спектра образцов.

выводы

Сконструированы высокоспецифичные праймеры для идентификации шести видов бактерий и двух вирусов, вызывающих пневмонию. Разработана и оптимизирована ОТ-ПЦР в иммобилизованной фазе и биологический микрочип для одновременного выявления нескольких возбудителей в исследуемом образце. Накопление флуоресцентного сигнала осуществляется встраиванием меченых нуклеотидов в растущую цепь ДНК. Разработанный прототип обладает открытой архитектурой, благодаря чему может быть расширен спектр анализируемых патогенных агентов. Система ориентирована на применение в клинических лабораториях, где нужно параллельно тестировать большое количество образцов и важно быстро получить ответ для выработки своевременной и адекватной стратегии лечения пациента.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (№ 20-14-00287).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Henig O., Kaye K.S. (2017) Bacterial pneumonia in older adults. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **31**, 689–713.
- Haq I.J., Battersby A.C., Eastham K., McKean M. (2017) Community acquired pneumonia in children. *BMJ (Clinical Res. ed.)*. 356, j686.
- 3. Ruuskanen O., Lahti E., Jennings L.C., Murdoch D.R. (2011) Viral pneumonia. *Lancet.* 9, 1264–1275.
- Galván J.M., Rajas O., Aspa J. (2015) Review of nonbacterial infections in respiratory medicine: viral pneumonia. *Arch. Bronconeumol.* 51, 590–597.
- 5. Dandachi D., Rodriguez-Barradas M.C. (2018) Viral pneumonia: etiologies and treatment. *J. Invest. Med.* **66**, 957–965.
- Chen X., Liao B., Cheng L., Peng X., Xu X., Li Y., Hu T., Li J. Zhou X., Ren B. (2020). The microbial coinfection in COVID-19. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 7777–7785.
- 7. Prasso J.E., Deng J.C. (2017) Postviral complications: bacterial pneumonia. *Clin. Chest. Med.* **38**, 127–138.
- Harris M., Clark J., Coote N., Fletcher P., Harnden A., McKean M., Thomson A. (2011) British thoracic society standards of care committee. British thoracic society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax*. 66(Suppl. 2), ii1–ii23.
- Budayanti N.S., Suryawan K., Iswari I.S., Sukrama D.M. (2019) The quality of sputum specimens as a predictor of isolated bacteria from patients with lower respiratory tract infections at a tertiary referral hospital, Denpasar, Bali-Indonesia. *Front. Med.* (Lausanne). 6, 64.
- Lee N., Rainer T.H., Ip M., Zee B., Ng M.H., Antonio G.E., Chan E., Lui G., Cockram C.S., Sung J.J., Hui D.S. (2006) Role of laboratory variables in differentiating SARS-coronavirus from other causes of community-acquired pneumonia within the first 72 h of
hospitalization. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 25, 765–772.

- Dorigo-Zetsma J.W., Zaat S.A., Wertheim-van Dillen P.M., Spanjaard L., Rijntjes J., van Waveren G., Jensen J.S., Angulo A.F., Dankert J. (1999) Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection in children. *J. Clin. Microbiol.* 37, 14–17.
- Cunha B.A. (2006) The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clin. Microbiol. Infect.* 12(Suppl.), 3, 12–24.
- Azoulay E., Russell L., Van de Louw A., Metaxa V., Bauer P., Povoa P., Montero J.G., Loeches I.M., Mehta S., Puxty K., Schellongowski P., Rello J., Mokart D., Lemiale V., Mirouse A. (2020) Diagnosis of severe respiratory infections in immunocompromised patients. *Intensive Care Med.* 46, 298–314.
- 14. Mabie M., Wunderink R.G. (2003) Use and limitations of clinical and radiologic diagnosis of pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* **18**, 72–79.
- Aydemir Y., Aydemir Ö., Pekcan S., Özdemir M. (2015) Value of multiplex PCR to determine the bacterial and viral aetiology of pneumonia in school-age children. *Paediatr. Int. Child Health.* 37, 29–34.
- Wagner K., Springer B., Imkamp F., Opota O., Greub G., Keller P.M. (2018) Detection of respiratory bacterial pathogens causing atypical pneumonia by multiplex Lightmix[®] RT-PCR. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 317– 323.
- Лапа С.А., Клочихина Е.С., Мифтахов Р.А., Золотов А.М., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2020) Мультиплексная ПЦР для выявления бактериальных возбудителей инфекционной пневмонии. Биоорган. химия. 46, 550–552.
- You H.-L., Chang S.-J., Yu H.-R., Li C.-C. Chen, C.-H., Liao W.-T. (2017) Simultaneous detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by onestep multiplex real-time RT-PCR in patients with respiratory symptoms. BMC Pediatrics, 17, 89.
- van Kasteren P.B., van der Veer B., van den Brink S., Wijsman L., de Jonge J., van den Brandt A., Molenkamp R., Reusken C.B.E.M., Meijer A. (2020) Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J. Clin. Virol.* **128**, 104412.
- Malhotra B., Swamy M.A., Reddy P.V.J., Kumar N., Tiwari J.K. (2016) Evaluation of custom multiplex real time RT-PCR in comparison to fast track diagnostics respiratory 21 pathogens kit for detection of multiple respiratory viruses. *Virol. J.* 13, 91.
- Zhang H., Wang Y., Porter E., Lu N., Li Y., Yuan F., Bai J. (2019) Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection and differentiation of influenza A, B, C and D viruses. *Diagn. Microbiol. Infect. Disease*. 95, 59–66.
- 22. Chung H.Y., Jian M.J., Chang C.K., Lin J.C., Yeh K.M., Chen C.W., Chiu S.K., Wang Y.H., Liao S.J., Li S.Y., Hsieh S.S., Tsai S.H., Perng C.L., Yang J.R., Liu M.T., Chang F.Y., Shang H.S. (2021) Novel dual multiplex real-time RT-PCR assays for the rapid detection of SARS-CoV-2, influenza A/B, and respiratory syncytial virus using the BD MAX open system. *Emerg. Microbes. Infect.* 10, 161–166.

- Zhou B., Deng Y.-M., Barnes J.R., Sessions O.M., Chou T.-W., Wilson M., Wentworth D. (2017) Multiplex reverse transcription-PCR for simultaneous surveillance of influenza A and B viruses. *J. Clin. Microbiol.* 55, 3492–3501.
- 24. Abarshi M.M., Mohammed I.U., Jeremiah S.C., Legg J.P., Kumar P.L., Hillocks R.J., Maruthi M.N. (2012) Multiplex RT-PCR assays for the simultaneous detection of both RNA and DNA viruses infecting cassava and the common occurrence of mixed infections by two cassava brown streak viruses in East Africa. J. Virol. Methods. 179, 176–184.
- 25. Malandraki I., Varveri C., Vassilakos N. (2018) Onestep multiplex quantitative RT-PCR for the simultaneous detection of viroids and phytoplasmas. *Methods Mol. Biol.* **1857**, 151–157.
- Lung O., Fisher M., Beeston A., Hughes K.B., Clavijo A., Goolia, M., Deregt D. (2011) Multiplex RT-PCR detection and microarray typing of vesicular disease viruses. *J. Virol. Methods.* 175, 236–245.
- Scuderi G., Catara A.F., Licciardello G. (2019) Genotyping citrus tristeza virus isolates by sequential multiplex RT-PCR and microarray hybridization in a Labon-Chip device. *Methods Mol. Biol.* 2015, 127–142.
- 28. Wilson K. (2001) Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr. Protoc. Molec. Biol.* **56**, 2.4.1–2.4.5.
- 29. Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., Fung A.Y., Ng A.C., Zou Z., Tsoi H.W., Choi G.K., Tam A.R., Cheng V.C., Chan K.H., Tsang O.T., Yuen K.Y. (2020) Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated *in vitro* and with clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 58(5), e00310–e00320.
- Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mipzabekov A.D. (2004) Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for largescale production. *Anal. Biochem.* 325, 92–106.
- Shershov V.E., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Polyakov S.A., Stomahin A.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. (2017) Comparative study of novel fluorescent cyanine nucleotides: hybridization analysis of labeled PCR products using a biochip. *J. Fluoresc.* 27, 2001–2016.
- 32. Лапа С.А., Клочихина Е.С., Мифтахов Р.А., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2021) Мультиплексная ПЦР на чипе с прямой детекцией удлинения иммобилизованного праймера. Биоорган. химия. https://doi.org/10.31857/S0132342321050298
- 33. Lapa S.A., Klochikhina E.S., Miftakhov R.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. (2021) Development of multi-primer PCR system with an open architecture for rapid detection of infectious pneumonia causative agents. *AIP Conf. Proc.* In Press.
- Mellroth P., Daniels R., Eberhardt A., Rönnlund D., Blom H., Widengren J., Normark S., Henriques-Normark B. (2012) LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 287, 11018–11029.

- Morona J.K., Morona R., Miller D.C., Paton J.C. (2002) *Streptococcus pneumoniae* capsule biosynthesis protein CpsB is a novel manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase. *J. Bacteriol.* 184, 577– 583.
- 36. Downer R., Roche F., Park P.W., Mecham R.P., Foster T.J. (2002) The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein J. Biol. Chem. 4, 243–250.
- 37. Abdeldaim G.M., Stralin K., Olcén P., Blomberg J., Mölling P., Herrmann B. (2013) Quantitative *fucK* gene polymerase chain reaction on sputum and nasopharyngeal secretions to detect *Haemophilus influenzae* pneumonia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **76**, 141–146.
- Llamas M.A., Rodríguez-Herva J.J., Hancock R.E., Bitter W., Tommassen J., Ramos J.L. (2003) Role of *Pseudomonas putida tol-oprL* gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 185, 4707–4716.
- 39. Gilmour M.W., Bernard K., Tracz D.M., Olson A.B., Corbett C.R., Burdz T., Ng B., Wiebe D., Broukhanski G., Boleszczuk P., Tang P., Jamieson F., Van Domselaar G., Plummer F.A., Berry J.D. (2007) Molecular typing of a *Legionella pneumophila* outbreak in Ontario, Canada. J. Med. Microbiol. 56, 336–341.
- Li G., Sun S., Zhao Z.Y., Sun Y. (2019) The pathogenicity of rmpA or aerobactin-positive *Klebsiella pneumoniae* in infected mice. *J. Int. Med. Res.* 47, 4344– 4352.
- Ishige T., Murata S., Taniguchi T., Miyabe A., Kitamura K., Kawasaki K., Nishimura M., Igari H., Matsushita K. (2020) Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. *Clin. Chim. Acta.* 507, 139–142.
- 42. Inui K., Nguyen T., Tseng H.J., Tsai C.M., Tsai Y.L., Chung S., Padungtod P., Zhu H., Guan Y., Kalpravidh W., Claes F. (2019) A field-deployable insulated isothermal RT-PCR assay for identification of influenza A (H7N9) shows good performance in the laboratory. *Influenza Other Respir. Viruses.* 13, 610–617.
- 43. Strizhkov B.N., Drobyshev A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. (2000) PCR amplification on a microarray of gel-immobilized oligonucleotides: detection of bacterial toxin- and drug-resistant genes and their mutations. *BioTechniques*. 29, 844–857.
- 44. Михайлович В.М., Лапа С.А., Грядунов Д.А., Стрижков Б.Н., Соболев А.Ю., Скотникова О.И., Иртуганова О.А., Мороз А.М., Литвинов В.И., Шипина Л.К., Владимирский М.А., Черноусова Л.Н., Ерохин В.В., Мирзабеков А.Д. (2001) Выявление устойчивых к рифампицину штаммов микобактерий туберкулеза методом гибридизации и полимеразной цепной реакции на специализированном туберкулезном микрочипе. Бюлл. эксп. биол. мед. 131, 94–98.
- 45. Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirskii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A. (2001) Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR,

and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. J. Clin. Microbiol. **39**, 2531–2540.

- 46. Tillib S.V., Strizhkov B.N., Mirzabekov A.D. (2001) Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip. *Anal. Biochem.* **292**, 155–160.
- Westin L., Xu X., Miller C., Wang L., Edman C.F., Nerenberg M. (2000) Anchored multiplex amplification on a microelectronic chip array. *Nat. Biotechnol.* 18, 199–204.
- Pemov A., Modi H., Chandler D.P., Bavykin S. (2005) DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR. *Nucl. Acids Res.* 33, e11.
- Lapa S., Mikheev M., Shchelkunov S., Mikhailovich V., Sobolev A., Blinov V., Babkin I., Guskov A., Sokunova E., Zasedatelev A., Sandakhchiev L., Mirzabekov A. (2002) Species-level identification of orthopoxviruses with an oligonucleotide microchip. *J. Clin. Microbiol.* 40, 753–757.
- Михеев М.В., Лапа С.А., Щелкунов С.Н., Чикова А.К., Михайлович В.М., Соболев А.Ю., Бабкин И.В., Грядунов Д.А., Булавкина М.А., Гуськов А.А., Сокунова Е.Б., Кочнева Г.В., Блинов В.М., Сандахчиев Л.С., Заседателев А.С., Мирзабеков А.Д. (2003) Видовая идентификация ортопоксвирусов на олигонуклеотидных микрочипах. *Вопр. вирусол.* 48, 4–9.
- Bespyatykh J.A., Zimenkov D.V., Shitikov E.A., Kulagina E.V., Lapa S.A., Gryadunov D.A., Ilina E.N., Govorun V.M. (2014) Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates using hydrogel oligonucleotide microarrays. *Infect. Genet. Evol.* 26, 41–46.
- 52. Рудинский Н.И., Михайлович В.М., Донников М.С., Лапа С.А., Суханова А.Л., Казеннова Е.В., Бобков А.Ф., Заседателев А.С., Покровский В.В., Мирзабеков А.Д. (2004) Разработка биологических микрочипов для выявления мутаций устойчивости ВИЧ-1 к ингибиторам протеазы и результаты их применения. *Вопр. вирусол.* 49, 10–15.
- 53. Gryadunov D., Mikhailovich V., Lapa S., Roudinskii N., Donnikov M., Pan'kov S., Markova O., Kuz'min A., Chernousova L., Skotnikova O., Moroz A., Zasedatelev A., Mirzabekov A. (2005) Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis. Clin. Microbiol. Infect.* **11**, 531–539.
- 54. Inglis P.W., Pappas M.C.R., Resende L.V., Grattapaglia D. (2018) Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for highthroughput SNP genotyping and sequencing applications. *PLoS One.* 13, e0206085.
- 55. Chiquito-Almanza E., Acosta-Gallegos J.A., García-Álvarez N.C., Garrido-Ramírez E.R., Montero-Tavera V., Guevara-Olvera L., Anaya-López J.L. (2017) Simultaneous detection of both RNA and DNA viruses infecting dry bean and occurrence of mixed infections by BGYMV, BCMV and BCMNV in the Central-West Region of Mexico. *Viruses.* 9, 63.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

DEVELOPMENT OF MULTIPLEX RT-PCR WITH IMMOBILIZED PRIMERS FOR IDENTIFICATION OF PATHOGENS OF HUMAN INFECTIOUS PNEUMONIA

S. A. Lapa^{1,} *, R. A. Miftakhov¹, E. S. Klochikhina¹, Yu. I. Ammur², S. A. Blagodatskikh³, V. E. Shershov¹, A. S. Zasedatelev¹, and A. V. Chudinov¹

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia ²Mechnikov Institute of Vaccines and Serums, Moscow, 105064 Russia ³Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, 142279 Russia

scientific Center of Applied Microbiology and Biotecnnology, Obolensk, Moscow Region, 1422/9 Russia *e-mail: lapa@biochip.ru

A prototype of a system based on multiplex PCR with reverse transcription (RT-PCR) in the immobilized phase for the detection of pathogens of infectious human pneumonia was developed. Primers has been designed to identify the DNA of six bacterial strains and the RNA of two viral pathogens of pneumonia: influenza A and SARS-CoV-2. The signal accumulation of elongated immobilized primers occurs due to the incorporation of fluorescently labeled nucleotides in the chain. The signal is detected after all the components of the mixture are removed, which significantly reduces the background and increases the sensitivity of the analysis. The use of a specialized detector makes it possible to read the signals of elongated primers directly through the transparent cover film of the reaction chamber. This solution is designed to prevent cross-contamination and is suitable for simultaneous testing of a large number of test samples. The proposed platform is able to detect the presence of several pathogens of pneumonia in a sample and has an open architecture that allows to expand the range of pathogenic bacteria and viruses that can be detected.

Keywords: RT-PCR in the immobilized phase, multiplex PCR, infectious pneumonia, influenza, SARS-CoV-2

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

РИСК РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА: АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ВАРИАНТАМИ ЯДЕРНОГО И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМОВ

© 2021 г. М. С. Козин^{*a*, *b*, *, И. С. Киселёв^{*a*, *b*}, Н. М. Баулина^{*a*, *b*}, Г. В. Павлова^{*a*, *b*}, А. Н. Бойко^{*a*}, О. Г. Кулакова^{*a*}, О. О. Фаворова^{*a*}}

^аРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения России, Москва, 117997 Россия ^bНаучно-технологический университет "Сириус", Сочи, 354340 Россия *e-mail: kozinmax1992@gmail.com Поступила в редакцию 15.02.2021 г.

После доработки 22.04.2021 г. Принята к публикации 07.05.2021 г.

В последнее время появляется все больше данных о том, что взаимодействие митохондриального и ядерного геномов в значительной степени определяет риск развития различных нейродегенеративных заболеваний. Однако роль мито-ядерных взаимодействий в развитии рассеянного склероза тяжелого хронического нейродегенеративного заболевания полигенной природы — мало изучена. Нами проведен анализ ассоциации с рассеянным склерозом всех возможных двухкомпонентных мито-ядерных сочетаний, включающих по одному из семи полиморфных вариантов ядерного генома, локализованных в области генов UCP2, KIF1B и в локусе PVT1 (гены MYC, PVT1 и MIR1208), и по одному из 10 полиморфизмов митохондриального генома, а также отдельных генетических вариантов, входящих в состав этих сочетаний. Исследование выполнено на выборке из 507 больных рассеянным склерозом и 321 здорового индивида контрольной группы (все русские по этнической принадлежности). Выявлено два ассоциированных с рассеянным склерозом сочетания, включающих ядерный и митохондриальный компоненты. Сочетание UCP2(rs660339)*A + MT-ATP6(rs193303045)*G характеризовалось значениями p = 0.015; ОШ = 1.39 [95% ДИ 1.05–1.87], сочетание *PVT1*(rs2114358)*G + + MT-ND1(rs1599988)*C – значениями p = 0.012, ОШ = 1.77 [95% ДИ 1.10–2.84]. Из отдельных компонентов сочетаний только аллель rs660339*А ядерного гена UCP2, кодирующего разобщающий белок 2 семейства митохондриальных переносчиков анионов, был самостоятельно ассоциирован с рассеянным склерозом (p = 0.028; ОШ = 1.36 [95% ДИ 1.01–1.84]). Проведенное исследование расширяет существующие представления о влиянии мито-ядерных взаимодействий и вариативности ядерных генов, продукты которых функционируют в митохондриях, на риск развития РС.

Ключевые слова: рассеянный склероз, генетическая предрасположенность, митохондриальный геном, ядерный геном, однонуклеотидный полиморфизм, ассоциация, мито-ядерные взаимодействия

DOI: 10.31857/S0026898421060070

введение

Рассеянный склероз (PC) – хроническое заболевание центральной нервной системы (ЦНС), для которого характерны процессы аутоиммунного воспаления, демиелинизации и нейродегенерации, приводящие к повреждению ЦНС и к прогрессирующей неврологической дисфункции [1]. По данным ВОЗ в мире насчитывается около 2.5 млн больных PC. РС это комплексное полигенное заболевание, которое развивается у генетически предрасположенных лиц при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды. В основе полигенного наследования РС лежит существование множества независимых и/или взаимодействующих полиморфных вариантов генов, каждый из которых лишь в незначительной степени влияет на риск развития заболевания [2]. В настоящее время методом широкогеномного анализа ассоциаций (ge-

Сокращения: ДИ – доверительный интервал; днРНК – длинная некодирующая РНК; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР–ПДРФ – ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; ОШ – отношение шансов; РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; ЭТЦ – электронно-транспортная цепь митохондрий; GWAS – широкогеномный поиск ассоциаций (Genome Wide Association Study); LD – неравновесное сцепление (Linkage Disequilibrium); SNP – однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphism); SF – фактор синергии (Synergy Factor).

nome-wide association studies, GWAS) выявлено более 200 независимых ядерных локусов, ассоциированных с развитием PC [3]. Два таких исследования выполнены для митохондриального генома [4, 5], однако не обнаружено ни одного варианта мтДНК, ассоциированного с PC с необходимым уровнем значимости. Совокупная вариабельность всех найденных локусов генома может объяснить только до 48% наблюдаемой наследуемости PC [3]. Это несоответствие получило название "недостающей" наследуемости (missing heritability) [6].

Одним из возможных объяснений феномена "недостающей" наследуемости может быть существование нелинейных (эпистатических) взаимодействий между компонентами генома, при которых эффект носительства генетического варианта одного гена зависит от носительства варианта другого, неаллельного, гена (генов), поскольку такие взаимодействия не выявляются при анализе ассоциации каждого из этих генов с заболеванием (по отдельности, one by one), в том числе при GWAS. Установлена вовлеченность эпистатических взаимодействий между генами ядерного и митохондриального геномов (мито-ядерного взаимодействия) в формировании патологического фенотипа при классических митохондриальных заболеваниях, а также при сахарном диабете типа 2, болезнях Паркинсона и Альцгеймера, шизофрении [7–9].

Хотя достоверно установлена важность дисфункции митохондрий в развитии нейродегенерации при PC [10] и показана связь вариабельности мтДНК с риском PC в различных популяциях (см. обзор [11]), мито-ядерные взаимодействия как фактор риска PC стали объектом изучения только в самое последнее время. Ранее мы выявили два ассоциированных с PC эпистатических сочетания, включающих один и тот же ядерный компонент — однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs4410871 гена длинной некодирующей PHK (днPHK) *PVT1* — и SNP rs1599988 (m.4216) или rs28359178 (m.13708) мтДНК [12].

В настоящей работе мы продолжили поиск мито-ядерных взаимодействий, влияющих на риск РС, включив в исследование новые варианты ядерных генов из локуса PVT1 – дополнительные SNP гена PVT1, SNP генов MYC и MIR1208, а также варианты ядерных генов за пределами этого локуса генов UCP2 и KIF1B, продукты которых влияют на функционирование митохондрий [13, 14]. Анализировали ассоциацию с развитием РС семи полиморфных вариантов перечисленных ядерных генов поодиночке и в составе сочетаний с 10 полиморфизмами мтДНК у этнических русских. Эти полиморфизмы расположены в области восьми генов, пять из которых кодируют митохондриальные белки — компоненты электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий (*MT-ND1*, *MT-ND2*,

MT-ND3, MT-ND5 и *COX1*), остальные гены – субъединицу 6 ATP-синтазы (*ATP6*), 16S рРНК (*MT-RNR2*) и лейцин-специфичную тРНК (*MT-TL2*). Описание этих SNP представлено в табл. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика индивидов, вошедших в исследование. Группа больных РС состояла из 507 индивидов (353 женщины, 154 мужчины), которым диагноз "достоверный РС" был поставлен согласно критериям МакДональда в редакции от 2010 года [15]. Средний возраст индивидов при дебюте заболевания составлял 27.5 \pm 9.2 лет, на момент исследования - 39.0 ± 10.6 лет. В контрольную группу вошел 321 здоровый индивид (210 женщин, 111 мужчин) без признаков неврологических заболеваний. Средний возраст в контрольной группе на момент забора крови – 39.6 ± \pm 13.5 лет. Все включенные в исследование индивиды были этническими русскими (согласно данным анкетирования русскими были все члены их семей в двух поколениях) и проживали в европейской части России.

Выделение ДНК и генотипирование. ДНК выделяли из цельной крови с использованием коммерческих наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit ("Qiagen", Германия). Генотипирование ядерных генов МҮС, PVT1, MIR1208, UCP2 и KIF1В проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на детектирующем амплификаторе StepOnePlus ("Thermo Fisher Scientific" , США); для rs660339, rs4645948, rs2114358 и rs10492972 использовали коммерческие наборы TaqMan Pre-designed SNP Genotyping Assay Kit ("Thermo Fisher Scientific"); для rs2648841, rs4733789 и rs7841504 — коммерческие наборы компании ООО "ДНК-Синтез" (Россия). Полиморфизмы мтДНК были генотипированы ранее [12] методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР–ПДРФ). Полиморфизм PVT1 rs4410871 также типирован ранее [16].

Статистический анализ. Анализ отклонения наблюдаемых частот генотипов исследованных полиморфных вариантов ядерного генома от равновесия Харди–Вайнберга, а также анализ структуры неравновесия по сцеплению (LD) между парами SNP в локусе PVT1 с помощью коэффициента D', предложенного Левонтином, и коэффициента корреляции r^2 Пирсона проводили с использованием программного обеспечения Haploview версии 4.2 [17]. При анализе ассоциации аллелей и генотипов SNP ядерного генома с PC использовали точный критерий Фишера; ассоциацию считали статистически значимой, если значение р было менее 0.05, а 95% доверительный интервал (ДИ) для отношения шансов (ОШ) не пересекал 1. Поиск ассоциированных с РС сочетаний,

Rs ID	Локус	Ген	Продукт гена*
Полиморфизмы ядерного генома			
rs4645948	PVT1 (8q24.21)	МҮС	Протоонкогенный белок Мус
rs4733789	PVT1 (8q24.21)	PVT1	Длинная некодирующая РНК
rs7841504	PVT1 (8q24.21)	PVT1	Длинная некодирующая РНК
rs2114358	PVT1 (8q24.21)	PVT1	Длинная некодирующая РНК
rs2648841	PVT1 (8q24.21)	MIR1208	микроРНК
rs10492972	1p36.22	KIF1B	Транспортный белок, член семейства кинезинов 1В
rs660339	11q13.4	UCP2	Разобщающий белок 2
Полиморфизмы митохондриального генома			
rs3928305	m.1719 G > A	MT-RNR2	16S pPHK
rs1599988	m.4216 T > C	MT-ND1	Субъединица 1 NADH-дегидрогеназы (комплекс І ЭТЦ)
rs28357975	m.4580 G > A	MT-ND2	Субъединица 2 NADH-дегидрогеназы (комплекс І ЭТЦ)
rs28357980	m.4917 A > G	MT-ND2	Субъединица 2 NADH-дегидрогеназы (комплекс І ЭТЦ)
rs2015062	m.7028 C > T	COX1	Субъединица 1 цитохром- <i>с</i> -оксидазы (комплекс IV ЭТЦ)
rs193303045	m.9055 G > A	ATP6	Субъединица 6 АТР-синтазы
rs2853826	m.10398 A > G	MT-ND3	Субъединица 3 NADH-дегидрогеназы (комплекс І ЭТЦ)
rs2853498	m.12308 A > G	MT-TL2	Лейцин-специфическая тРНК
rs3899498	m.13368 G > A	MT-ND5	Субъединица 5 NADH-дегидрогеназы (комплекс І ЭТЦ)
rs28359178	m.13708 G > A	MT-ND5	Субъединица 5 NADH-дегидрогеназы (комплекс І ЭТЦ)

Таблица 1. Характеристика включенных в исследование полиморфных участков ядерного и митохондриального геномов

* ЭТЦ – электрон-транспортная цепь митохондрий.

включающих аллели/генотипы полиморфных участков яДНК и мтДНК, проводили с помощью программного обеспечения APSampler (http://apsampler.sourceforge.net), использующего метод Монте-Карло марковскими цепями и Байесовскую непараметрическую статистику [18]. Валидацию результатов проводили при помощи стандартных статистических подходов - оценки значения p в точном критерии Фишера, ОШ и его 95% ДИ. Сочетания считали ассоциированными с РС, если отдельные его компоненты характеризовались значением p, большим, чем значение p сочетания. Возможное нелинейное взаимодействие (эпистаз) между аллелями в биаллельных сочетаниях оценивали с использованием подхода, предложенного в [19]. В его основе лежит оценка характера взаимодействия между аллелями (или генотипами) двух локусов при их совместном носительстве с помощью двух ранее описанных статистических критериев: по значению p_{FLINT} в точном трехфакторном тесте, подобном точному критерию Фишера (the exact threeway Fisher-like interaction numeric test, FLINT) [20], и исходя из значений фактора синергии (synergy factor, SF) и его 95% ДИ [21]. Значения *p*_{FLINT}, SF и его 95% ДИ оценивали с помощью программных средств, входящих в программу APSampler. Взаимодействие между аллелями в сочетании считали эпистатическим при величине p_{FLINT} менее 0.05, а значение 95% ДИ для SF не пересекало 1; если эти условия не соблюдались, взаимодействие считали аддитивным.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Равновесие Харди—Вайнберга соблюдалось в контрольной группе (p > 0.05) для всех генотипированных полиморфных участков яДНК, а также для исследованного ранее rs4410871 гена *PVT1*.

На рис. 1 представлены наблюдавшиеся нами частоты аллелей, включенных в исследование SNP ядерного генома, в контрольной группе в сравнении с частотами их минорных аллелей (MAF) в выборке представителей европейских популяций из базы данных NCBI SNP. Абсолютные отличия частот аллелей всех исследованных полиморфных участков, наблюдаемые у этнических русских, от данных, представленных в базе NCBI, составляют менее 5%.

В контрольной группе этнических русских мы проанализировали неравновесное сцепление между всеми SNP локуса PVT1, типированными в настоящем исследовании (rs2648841, rs4733789, rs7841504, rs2114358, rs4645948), а также rs4410871 из этого локуса, генотипированного ранее [16]. Структура неравновесного сцепления SNP пред-



Рис. 1. Частоты аллелей исследованных SNP ядерного генома в контрольной группе этнических русских в сравнении с частотами минорных аллелей (MAF) в выборке представителей европейских популяций из базы данных NCBI SNP.



Рис. 2. Анализ структуры неравновесия по сцеплению (LD) полиморфных вариантов локуса PVT1 в контрольной группе этнических русских с помощью коэффициентов D' (*a*) и $r^2(\delta)$.

ставлена на рис. 2. Значение D' для отдельных пар полиморфизмов превышало 0.6, однако значение r^2 не превышало 0.1 ни для одной из пар полиморфизмов, что свидетельствует об отсутствии сцепления.

Проведен анализ ассоциации с РС полиморфных вариантов ядерного генома. Среди семи исследованных полиморфизмов только rs660339 гена *UCP2* был значимо ассоциирован с РС. При этом значимое повышение риска PC характерно для носительства аллеля A (p = 0.028; OIII = 1.36 [95% ДИ 1.01–1.84]) (табл. 2) и для носительства гетерозиготного генотипа AG (p = 0.011; OIII = 1.40 [95% ДИ 1.06–1.85]). Ассоциации всех остальных исследованных полиморфизмов с PC не были статистически значимыми.

Поиск ассоциированных с РС биаллельных сочетаний, включающих полиморфные вариан-

	Носители, n (%)				
Биаллельное сочетание	больные РС (<i>N</i> = 507)	индивиды контрольной группы (N = 321)	Значение р	ОШ [95% ДИ]	
Ассоциированные с РС биаллельные сочетания,					
включающие ядерный и митохондриальный компоненты					
<i>PVT1</i> (rs2114358)*G + + m.4216(rs1599988)*C	66 (13.0)	25 (7.8)	0.012	1.77 [1.10-2.84]	
<i>UCP2</i> (rs660339)*A + + m.9055(rs193303045)*G	339 (66.8)	190 (59.2)	0.015	1.39 [1.05–1.87]	
Компоненты биаллельных сочетаний					
<i>UCP2</i> (rs660339)*A	365 (72.0)	210 (65.4)	0.028	1.36 [1.01-1.84]	
m.9055(rs193303045)*G	472 (93.0)	290 (90.3)	0.10	1.42 [0.86-2.38]	
m.4216(rs1599988)*C	103 (20.3)	57 (17.8)	0.21	1.18 [0.83-1.70]	
<i>PVT1</i> (rs2114358)*G	305 (60.2)	186 (58.0)	0.29	1.10 [0.82-1.45]	

Таблица 2. Ассоциированные с PC биаллельные сочетания, включающие митохондриальный и ядерный компоненты, анализ ассоциации этих компонентов с PC

Примечание. ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал. Полужирным выделены значимые ассоциации.

Таблица 3. Характер взаимодействий между компонентами сочетаний, ассоциированных с рассеянным склерозом

Аллельное сочетание	Значение <i>p</i> _{FLINT}	SF [95% ДИ]
<i>PVT1</i> (rs2114358)*G + m.4216(rs1599988)*C	0.054	2.19 [1.03-4.66]
<i>UCP2</i> (rs660339)*A + m.9055(rs193303045)*G	0.78	0.80 [0.27-2.43]

Примечание. p_{FLINT} — значение p в точном трехфакторном тесте, подобном точному критерию Фишера (the exact three-way Fisher-like interaction numeric test, FLINT); SF — фактор синергии; ДИ — доверительный интервал.

ты ядерного и митохондриального геномов, проводили с использованием мультилокусного анализа при помощи APSampler. Ассоциированные с PC сочетания содержали аллель ядерного гена *PVT1*(rs2114358)*G или *UCP2*(rs660339)*A, а в качестве второго компонента в состав этих сочетаний входили аллели мтДНК m.4216(rs1599988)*C и m.9055(rs193303045)*G соответственно (табл. 2). Только носительство аллеля *UCP2*(rs660339)*A, ядерного компонента второго сочетания, было значимо ассоциировано с PC, хотя и с меньшим уровнем значимости, чем у всего сочетания. Ассоциации с PC аллелей *PVT1*(rs2114358)*G, m.9055(rs193303045)*G и m.4216(rs1599988)*C поодиночке не обнаружено.

Еще два сочетания, MYC(rs4645948)*C + + m.4216(rs1599988)*C и MIR1208(rs2648841)*C + + mt7028(rs2015062)*G, имели значения *p* меньше 0.05, однако доверительный интервал отношения шансов для этих сочетаний пересекал 1. Эти сочетания не были включены в дальнейшее рассмотрение.

При помощи метода, предложенного в [19], проанализировали природу взаимодействия между компонентами выявленных сочетаний, ассоциированных с PC (табл. 3). Обнаружили аддитивный вклад носительства компонентов ядерного и митохондриального геномов в составе сочетания UCP2(rs660339)*A + m.9055(rs193303045)*G. В сочетании PVT1(rs2114358)*G + m.4216(rs1599988)*C взаимодействие, согласно значениям фактора SF и его 95% ДИ, носит эпистатический характер, однако величина p_{FLINT} составляет 0.054, т.е. превышает выбранный нами уровень <0.05.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С целью изучения сочетанного влияния ядерного и митохондриального геномов на риск развития РС нами проведен анализ ассоциации с этим заболеванием семи SNP пяти ядерных генов в составе сочетаний с 10 SNP мтДНК. Выявлены два сочетания аллелей ядерной и митохондриальной ДНК – *PVT1*(rs2114358)*G + m.4216(rs1599988)*C и *UCP2*(rs660339)*A + m.9055(rs193303045)*G, значимо ассоциированных с PC, тогда как их компоненты или не были ассоциированы с заболеванием



Рис. 3. Схематическое изображение строения локуса PVT1 на хромосоме 8 (8q24.21). Синим цветом обозначены гены днРНК – *PVT1* и *TMEM75*, зеленым – остальные гены локуса. Показана экзон-интронная структура генов *PVT1*, *MYC* и *CASC11*. Красным обозначены SNP в гене *PVT1*, входящие в состав выявленных нами сочетаний с митохондриальными генами: rs2114358 (данные настоящего исследования) и rs4410871 (данные [12]). Остальные исследованные нами SNP обозначены зеленым шрифтом.

поодиночке, или ассоциированы с меньшим уровнем значимости.

Ранее [12] мы обнаружили два ассоциированных с РС сочетания (оба эпистатические), включающих в качестве ядерного компонента SNP rs4410871 гена РНК PVT1, а в качестве митохондриальных компонентов SNP генов первой и пятой субъединиц NADH-дегидрогеназы (первый комплекс ЭТЦ).

Ген *PVT1* расположен в локусе 8q24, который иногда называют "генной пустыней" [22], поскольку в нем почти отсутствуют белоккодирующие гены, за исключением гена *MYC*, продукт которого участвует в прохождении клеточного цикла, апоптозе и метаболизме [23]. Первый интрон гена *PVT1* содержит ген микроPHK *MIR1204*; другие интроны содержат гены *MIR1205*, *MIR1206* и *MIR1207*, а также псевдогены *RNU1-106P*, *RNU4-25P* и еще один ген днPHK *TMEM75*. Помимо этого, в локусе PVT1 расположен ген *MIR1208*. Положение исследованных SNP в локусе представлено на рис. 3.

С целью более детального анализа вовлеченности участков локуса PVT1 в развитие PC в исследование включили пять не изученных нами ранее SNP локуса PVT1, потенциально способных влиять на функционирование генов локуса. Полиморфные варианты rs4733789 и rs7841504 расположены в первом интроне гена PVT1. Выбор этих SNP обусловлен данными о присутствии внутри первого интрона гена PVT1 энхансера 822E, способного связываться как с промотором самого *PVT1*. так и с промотором гена МҮС [24]. По данным базы The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project, полиморфизм rs4733789 влияет на экспрессию обоих этих генов. Вариант rs4645948 включен в исследование исходя из данных о его влиянии на уровень экспрессии гена МҮС. Так, согласно [25], носители генотипов rs4645948*CT и rs4645948*TT ха-

рактеризуются более высоким уровнем экспрессии МҮС, чем носители генотипа СС. На культурах клеток HONE1 и HNE1С назофарингеальной карциномы с использованием репортерного гена люциферазы показано, что носительство аллеля rs4645948*Т приводит к значительно более высокой транскрипционной активности МҮС по сравнению с носительством аллеля С. Включенный в наше исследование SNP rs2114358 находится в интроне 5 гена *PVT1*, в котором локализуется ген MIR1206, и, как показано in silico, влияет на структуру зрелой miR-1206 [26]. Наконец, полиморфизм rs2648841, расположенный в локусе PVT1 в области pre-miR-1208, выбран для исследования исходя из его потенциального влияния на эффективность сплайсинга miR-1208.

Нам не удалось показать ассоциацию с РС ни одного из исследованных в настоящей работе SNP локуса *PVT1*, однако выявлено ассоциированное с РС биаллельное сочетание rs2114358 гена *PVT1* с митохондриальным компонентом (rs1599988 гена *MT-ND1*). Это сочетание можно отнести к эпистатическим согласно одному из используемых нами критериев — значению фактора SF [21], однако значение p_{FLINT} второго применяемого нами критерия — точного трехфакторного теста [20], равное 0.054, превышает выбранный нами уровень значимости <0.05.

Полученные результаты можно расширить данными еще для одного полиморфизма в локусе PVT1: в нашей предыдущей работе [12] выявлено ассоциированное с PC мито-ядерное сочетание с эпистатическим характером взаимодействия, которое включало митохондриальный SNP m.13708 и SNP гена *PVT1* rs4410871 в качестве ядерного компонента. Таким образом, ни один из шести исследованных нами SNP в локусе PVT1 не ассоциирован с PC самостоятельно, но два из них, rs4410871 и rs2114358, входят в состав ассоциированных с PC мито-ядерных сочетаний. Полученные нами данные позволяют предположить, что днРНК PVT1 вовлечена в регуляцию функционирования митохондрий. Это предположение находит подтверждение в работе [27], в которой показано, что PVT1 участвует в модуляции митохондриальной сети, а подавление экспрессии гена *Pvt1* в культуре мышечных клеток мыши приводит к усилению экспрессии генов, связанных с митохондриями.

Помимо полиморфных участков в локусе PVT1 на хромосоме 8, в настоящее исследование включены полиморфизмы ядерных генов UCP2 (хромосома 11) и KIF1B (хромосома 11). В нашей работе rs660339 гена UCP2 оказался ассоциированным с РС у этнических русских. Ассоциация rs660339 гена UCP2 с PC показана ранее в испанской популяции [28]. Продукт гена UCP2 – белок семейства митохондриальных переносчиков анионов (mitochondrial anion carrier proteins, MACP), участвует в разобщении процесса окислительного фосфорилирования, в результате чего вместо синтеза АТР происходит диссипация энергии в виде тепла. Белок UCP2 осуществляет перенос анионов из матрикса митохондрий в межмебранное пространство и перенос протонов в противоположную сторону. Известно, что белок UCP2 влияет на количество образующихся в митохондриях свободных радикалов, которые относятся к повреждающим факторам и играют существенную роль в патогенезе РС.

Этот полиморфизм вошел также в состав ассоциированного с PC мито-ядерного сочетания, вторым компонентом которого выступал аллель G rs193303045 гена *MT-ATP6*, кодирующего субъединицу 6 митохондриальной ATP-синтазы. Показано, что взаимодействие между компонентами сочетания имеет аддитивный характер, другими словами, при совместном носительстве *UCP2*(rs660339)*А и *MT*-ATP6(rs193303045)*G эффекты каждого из этих аллелей складываются.

Продукт гена *KIF1B* – моторный белок, отвечающий за антероградный транспорт митохондрий и синаптических везикул в аксонах нейронов. Данные по его ассоциации с РС носят противоречивый характер. Ассоциация аллеля С полиморфизма rs10492972 с PC [29] показана методом GWAS на полногеномном уровне значимости ($p = 2.5 \times$ \times 10⁻¹⁰), однако участникам International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) не удалось воспроизвести этот результат [30]. В недавнем исследовании, выполненном на русской популяции жителей Пермского края, показано влияние аллеля Т полиморфизма rs10492972 на выраженность клинических проявлений по шкалам EDSS и SCRIPPS [31]. В нашем исследовании этот полиморфизм не был ассоциирован с риском РС.

В целом, наше исследование указывает на влияние ядерных генов, функционирующих в митохонлриях. и мито-ялерных генетических взаимодействий на риск развития РС. Разработка подходов, облегчающих оценку совокупных эффектов вариантов митохондриальных и ядерных ДНК на риск РС, будет иметь решающее значение для выявления "недостающей" наследуемости, поскольку на сегодняшний день ясно, что анализ эффектов каждого отдельного гена на риск полигенного заболевания не обеспечивает достаточной прогностической силы. Однако настоящее исследование выполнено на относительно небольшом количестве пациентов; полученные результаты не проходят поправку на множественные сравнения и могут быть ложноположительными. Несомненно, полученные результаты нуждаются в воспроизведении на независимой выборке.

Работа подготовлена в рамках Государственного задания АААА-А19-119042590026-5 и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта №19-315-51003.

Все процедуры, использованные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех участников получено информированное письменное согласие на участие в экспериментах.

Авторы сообщают об отсутствии потенциального конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Karussis D. (2014) The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. *J. Autoimmun.* **48–49**, 134–142.
- Baranzini S.E., Oksenberg J.R. (2017) The genetics of multiple sclerosis: from 0 to 200 in 50 years. *Trends Genet.* 33(12), 960–970.
- 3. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. (2019) Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*. **365**(6460), eaav7188.
- Tranah G.J., Santaniello A., Caillier S.J., D'Alfonso S., Boneschi F.M., Hauser S.L., Oksenberg J.R. (2015) Mitochondrial DNA sequence variation in multiple sclerosis. *Neurology*. 85(4), 325–330.
- Hudson G., Gomez-Duran A., Wilson I.J., Chinnery P.F. (2014) Recent mitochondrial DNA mutations increase the risk of developing common late-onset human diseases. *PLoS Genet.* 10(5), e1004369.
- 6. Maher B. (2008) Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature*. **456**(7218), 18–21.
- Morrow E.H., Camus M.F. (2017) Mitonuclear epistasis and mitochondrial disease. *Mitochondrion*. 35, 119– 122.

- Andrews S.J., Fulton-Howard B., Patterson C., Mc-Fall G.P., Gross A., Michaelis E.K., Goate A., Swerdlow R.H., Pa J., Alzheimer's disease neuroimaging initiative. (2020) Mitonuclear interactions influence Alzheimer's disease risk. *Neurobiol. Aging.* 87, 138.e7– 138.e14.
- Schulmann A., Ryu E., Goncalves V., Rollins B., Christiansen M., Frye M.A., Biernacka J., Vawter M.P. (2019) Novel complex interactions between mitochondrial and nuclear DNA in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol. Neuropsychiatry*. 5(1), 13–27.
- 10. Campbell G., Mahad D.J. (2018) Mitochondrial dysfunction and axon degeneration in progressive multiple sclerosis. *FEBS Lett.* **592**(7), 1113–1121.
- Козин М.С., Кулакова О.Г., Фаворова О.О. (2018) Участие митохондрий в развитии нейродегенерации при рассеянном склерозе. *Биохимия*. 83(7), 1002–1021.
- Kozin M., Kulakova O., Kiselev I., Baulina N., Boyko A., Favorova O. (2020) Mitonuclear interactions influence multiple sclerosis risk. *Gene.* **758**, 144962.
- Pareyson D., Saveri P., Sagnelli A., Piscosquito G. (2015) Mitochondrial dynamics and inherited peripheral nerve diseases. *Neurosci. Lett.* 596, 66–77.
- 14. Hass D.T., Barnstable C.J. (2021) Uncoupling proteins in the mitochondrial defense against oxidative stress. *Prog. Retin. Eye. Res.* **8**, 100941.
- Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., Clanet M., Cohen J.A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Lublin F.D., Montalban X., O'Connor P., Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Waubant E., Weinshenker B., Wolinsky J.S. (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 69(2), 292–302.
- Kiselev I., Bashinskaya V., Baulina N., Kozin M., Popova E., Boyko A., Favorova O., Kulakova O. (2019) Genetic differences between primary progressive and relapsing-remitting multiple sclerosis: The impact of immune-related genes variability. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 29, 130–136.
- Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 21(2), 263–265.
- Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M.F. (2005) A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans. *Genetics.* 171, 2113–2121.
- Barsova R.M., Lvovs D., Titov B.V., Matveeva N.A., Shakhnovich R.M., Sukhinina T.S., Kukava N.G., Ruda M.Y., Karamova I.M., Nasibullin T.R., Mustafina O.E., Osmak G.J., Tsareva E.Y., Kulakova O.G., Favorov A.V., Favorova O.O. (2015) Variants of the coagulation and inflammation genes are replicably associated with myocardial infarction and epistatically interact in Russians. *PLoS One.* 10, 1–16.
- White D.R., Pesner R., Reitz K.P. (1983) An exact significance test for three-way interaction effects. *Cross-Cultural Res.* 18, 103–122.

- Cortina-Borja M., Smith A.D., Combarros O., Lehmann D.J. (2009) The synergy factor: a statistic to measure interactions in complex diseases. *BMC Res. Notes.* 2, 1–7.
- 22. Huppi K., Pitt J.J., Wahlberg B.M., Caplen N.J. (2012) The 8q24 gene desert: an oasis of non-coding transcriptional activity. *Front. Genet.* **3**, 1–11.
- Stine Z.E., Walton Z.E., Altman B.J., Hsieh A.L., Dang C.V. (2015) MYC, metabolism, and cancer. *Cancer Discov.* 5(10), 1024–1039.
- Cho S.W., Xu J., Sun R., Mumbach M.R., Carter A.C., Chen Y.G., Yost K.E., Kim J., He J., Nevins S.A., Chin S.F., Caldas C., Liu S.J., Horlbeck M.A., Lim D.A., Weissman J.S., Curtis C., Chang H.Y. (2018) Promoter of lncRNA gene *PVT1* is a tumor suppressor DNA boundary element. *Cell.* 173(6), 1398–1412.e22.
- Guo Z., Wang Y., Zhao Y., Guo Z., Wang Y., Zhao Y., Jin Y., An L., Xu H., Liu Z., Chen X., Zhou H., Wang H., Zhang W. (2019) A functional 5'-UTR polymorphism of *MYC* contributes to nasopharyngeal carcinoma susceptibility and chemoradiotherapy induced toxicities. *J. Cancer.* 10(1), 147–155.
- 26. Martin-Guerrero I., Gutierrez-Camino A., Lopez-Lopez E., Bilbao-Aldaiturriaga N., Pombar-Gomez M., Ardanaz M., Garcia-Orad A. (2015) Genetic variants in miRNA processing genes and pre-miRNAs are associated with the risk of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One.* **10**(3), e0118905.
- Alessio E., Buson L., Chemello F., Peggion C., Grespi F., Martini P., Massimino M.L., Pacchioni B., Millino C., Romualdi C., Bertoli A., Scorrano L., Lanfranchi G., Cagnin S. (2019) Single cell analysis reveals the involvement of the long non-coding RNA Pvt1 in the modulation of muscle atrophy and mitochondrial network. *Nucl. Acids Res.* 47(4), 1653–1670.
- Otaegui D., Saenz A., Ruiz-Martinez J., Olaskoaga J., López de Munain A. (2007) UCP2 and mitochondrial haplogroups as a multiple sclerosis risk factor. *Mult. Scler.* 13(4), 454–458.
- Aulchenko Y.S., Hoppenbrouwers I.A., Ramagopalan S.V., Broer L., Jafari N., Hillert J., Link J., Lundström W., Greiner E., Sadovnick A.D., Goossens D., Van Broeckhoven C., Del-Favero J., Ebers G.C., Oostra B.A., van Duijn C.M., Hintzen R.Q. (2008) Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 40(12), 1402–1403.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) (2010) Lack of support for association between the *KIF1B* rs10492972[C] variant and multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 42(6), 469–470.
- Арбузова Е.Е., Селянина Н.В., Каракулова Ю.В. (2019) Ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов гена *KIF1B* с выраженностью клинических проявлений рассеянного склероза. *Ж. Неврол. Психиатр. им. С.С. Корсакова.* 119(10–2), 58–62.

RISK OF MULTIPLE SCLEROSIS: ANALYSIS OF INTERACTIONS BETWEEN VARIANTS OF NUCLEAR AND MITOCHONDRIAL GENOMS

M. S. Kozin^{1, 2, *}, I. S. Kiselev^{1, 2}, N. M. Baulina^{1, 2}, G. V. Pavlova^{1, 2}, A. N. Boyko¹, O. G. Kulakova¹, and O. O. Favorova¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Faderation, Moscow, 117997 Russia ² Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia *e-mail: kozinmax1992@gmail.com

Recently, there is an increasing evidence that the interaction of the mitochondrial and nuclear genomes substantially affects the risk of neurodegenerative diseases. The role of mito-nuclear interactions in the development of multiple sclerosis, a severe chronic neurodegenerative disease of a polygenic nature, is poorly understood. In this work, we analyzed the association with multiple sclerosis of two-component mitonuclear combinations that include each of seven polymorphic variants of the nuclear genome localized in the region of the UCP2, KIF1B genes and in the PVT1 locus (MYC, PVT1, and MIR1208 genes) and each of ten polymorphisms of the mitochondrial genome, as well as individual genetic variants that make up these combinations. Association of the individual components of these combinations with multiple sclerosis was also evaluated. 507 patients with multiple sclerosis and 321 healthy individuals were enrolled in the study, all participants were ethnic Russians. Two mito-nuclear combinations associated with multiple sclerosis were identified: UCP2 (rs660339) * A + MT-ATP6 (rs193303045) * G combination was characterized by p-value = 0.015 and OR = 1.39 [95% CI 1.05-1.87], and PVT1 (rs2114358) * G + MT-ND1 (rs1599988) * C combination - by p-value = 0.012 and OR = 1.77 [95% CI 1.10-2.84]. Only one of the individual components of these combinations, allele rs660339 * A of the nuclear gene UCP2 encoding uncoupling protein 2 of the mitochondrial anion carrier family, was independently associated with multiple sclerosis (p = 0.028; OR = 1.36 [95% CI 1.01–1.84]). This study expands the current understanding of the role of mito-nuclear interactions and variance of nuclear genes, which products function in mitochondria, in MS risk.

Keywords: multiple sclerosis, genetic predisposition, mitochondrial genome, nuclear genome, single nucleotide polymorphism, association, mito-nuclear interaction

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.27

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ГОМЕОДОМЕНСОДЕРЖАЩЕГО ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА PREP1 В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СЕРДЦА

© 2021 г. Ю. С. Стафеев^а, Е. К. Шевченко^а, М. А. Болдырева^а, Д. Н. Пеньков^{а, *}

^аНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 121552 Россия

> **e-mail: dpenkov@yahoo.com* Поступила в редакцию 18.06.2020 г. После доработки 11.05.2021 г. Принята к публикации 11.05.2021 г.

Гомеодоменсодержащие транскрипционные факторы играют важную роль в мезенхимальных стромальных клетках (MCK). Ранее была установлена роль Meis1, Pbx1 и Prep1, белков из семейства TALE (Three Amino acid Loop Extension), в адипоцитарной и остеогенной дифференцировке MCK мыши. Используя метод иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием (ChIP-seq) и биоинформатический анализ, мы исследовали паттерн связывания PREP1 с геномной ДНК МСК сердца человека, идентифицировали близлежащие гены и проанализировали их онтологию. На основании полученных результатов обсуждается возможное участие фактора транскрипции PREP1 в прямом репрограммировании фибробластов в кардиомиоциты.

Ключевые слова: кардиомиоцит, мезенхимальные стромальные клетки, транскрипционный фактор, PREP1

DOI: 10.31857/S0026898421060124

Большинство заболеваний сердца связано с гибелью клеток миокарда и образованием в нем очагов фиброза [1]. Одна из проблем лечения пациентов, перенесших острый инфаркт миокарда, связана с замещением кардиомиоцитов фибробластами в месте инфаркта сердечной мышцы (фиброза миокарда), что ведет к нарушению ее функции и развитию сердечной недостаточности. В решении этой проблемы может помочь перспективное направление медицины, основанное на терапии с использованием клеток, полученных с помощью кардиомиоцитарной дифференцировки индуцированных плюрипотентных клеток [2–4], а также прямого репрограммирования фибробластов в кардиомиоциты [5-8]. Вместе с тем эффективность прямого репрограммирования в настоящее время остается слишком низкой, а образующиеся клетки в большинстве своем гетерогенны. В качестве исходных клеток в этих методах можно использовать фибробласты непосредственно из очагов фиброза, а также мезенхимальные стромальные клетки (МСК), содержащиеся в сердце. В ряде работ была исследована роль различных кардиомицитспецифических транскрипционных факторов в этом процессе – на уровне как клеточных популяций, так и единичных клеток [5, 9]. В результате проведенных исследований показано, что те факторы транскрипции, которые играют центральную роль в процессе дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в кардиомиоциты, необходимы также для прямого репрограммирования.

Белок PREP1 относится к гомеодоменсодержащим факторам, играющим ключевую роль в дифференцировке различных клеток посредством регуляции ряда генов [10, 11]. Его участие в процессах развития сердца обсуждают в связи с тем, что мыши с нокаутом гена *Prep1* в предшественниках клеток сердца летальны в эмбриональном развитии [12]. Белок PREP1 высокоэкспрессирован в кардиомиоцитах, однако его связывание с хроматином на уровне полного генома ранее не изучалось.

В представленной работе исследована возможная роль транскрипционного фактора PREP1 в процессе репрограммирования клеток. Мы определили полногеномный профиль связывания фактора PREP1 в сердечных MCK и описали распределение связывания PREP1 с ДНК в зависимости от расположения регуляторных элементов (промоторов, энхансеров) в геноме. Биоинформатический анализ использован для выяснения возможной роли фактора PREP1 в репрограммировании мезенхимальных клеток в кардиомиоциты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. Биоптаты клеток получены из биобанка здоровых доноров после смерти в течение не более 24 ч (любезно предоставлены Dr. Elena Sommariva из Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milan, Италия). Во всех экспериментах использована ткань из стенки правого желудочка. Во время транспортировки биоптаты хранили в среде TMES при 4°C. TMES представляет собой среду Дульбекко в модификации Искова (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM; "Hyclone", США) с добавлением 20% фетальной телячьей сыворотки (FBS; "Hyclone", США) и 10 нг/мл фактора роста фибробластов (basic FGF; "R&D Systems", США).

Суспензионную культуру клеток получали обработкой ткани раствором коллагеназы (NB4; 'Thermo Fisher Scientific", США) в TMES по нижеприведенной методике. Биоптаты дважды промывали 3 мл стерильного PBS. Образцы помещали в двухмиллилитровые пробирки с 1 мл раствора 3 мг/мл коллагеназы в TMES и разрезали стерильными ножницами на кусочки размером 0.5-1 мм³, которые инкубировали в том же буфере в течение 1.5 ч при 37°С при постоянном перемешивании и затем центрифугировали при 400 × g в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученный осадок после промывки ресуспендировали в TMES, переносили в стерильную 60-миллиметровую чашку и добавляли TMES до объема 3 мл. Планшет инкубировали при 37°С в течение 24 ч, после чего клетки промывали стерильным PBS и среду заменяли на новую [13].

Иммунопреципитация хроматина и секвенирование (ChIP-seq). Иммунопреципитацию хроматина проводили с использованием стандартного метода с антителом к PREP1 (N-15; "Santa Cruz Biotechnology", США). Клетки фиксировали в течение 10 мин в среде DMEM с 10% FBS и 1% формальдегида. Реакцию останавливали добавлением глицина (конечная концентрация 125 мМ). Фиксированные клетки промывали трижды по 5 мин холодным PBS и лизировали в буфере LB1, содержащем 0.5% NP-40 и 0.25% Triton X-100. Полученные ядра промывали в буфере LB2 (10 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 200 мМ NaCl) для удаления детергентов и ресуспендировали в буфере LB3, содержащем 0.1% дезоксихолата натрия и 0.5% натриевой соли *N*-лаурилсаркозина. Полученный хроматин дробили ультразвуком в аппарате Covaris ("COVARIS", США) до фрагментов размером 150-250 п.о. и инкубировали с магнитными частицами Dynabeads ("Invitrogen", США), предварительно конъюгированными с антителами к PREP1 ("Invitrogen"). Для каждой иммунопреципитации использовали 20 мкг антитела. Иммунопреципитацию с IgG кролика использовали в качестве отрицательного контроля. После инкубации в течение ночи при 4°С частицы со связанными комплексами дважды промывали в растворах WB1 (50 мМ HEPES-KOH, pH 7.5, 140 MM NaCl, 1 MM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% дезоксихолат натрия), дважды в WB2 (50 мМ НЕРЕЅ-КОН, pH 7.5, 500 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% дезоксихолат натрия) и дважды в LiCl-WB (10 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 250 мМ LiCl. 0.5% NP-40. 0.5% дезоксихолат натрия, 1 мМ EDTA). Иммунопреципитированные комплексы элюировали с частиц буфером для элюции: Трис-HCl. pH 8.0. 1 мМ EDTA. 2% SDS в течение 30 мин при 65°С, после чего элюат инкубировали еще 12 ч при 65°С. ДНК очищали с помощью набора для очистки фрагментов ПЦР ("QIAGEN", Нидерланды).

Около 10 нг иммунопреципитированной ДНК использовали для секвенирования. После подготовки библиотеки по стандартной методике ДНК секвенировали с использованием системы Ion-Torrent ("Thermo Fisher Scientific"). Артефакты устраняли с помощью программы FASTX-Toolkit v.0.0.13.2 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/), фрагменты собирали с использованием генома человека hg19 с использованием Bowtie v.0.12.8 (http://bowtie-bio.sourceforge.net). Повторяющиеся фрагменты ДНК удаляли с помощью Samtoolrmdup v 0.1.18.

Сайты связывания фактора PREP1 с геномом идентифицировали с использованием программы MACS 2.0 (https://github.com/macs3-project/ MACS) с $p < 10^{-5}$. Для анализа использовались BAM-файлы после иммунопреципитации (IP) и до иммунопреципитации (input). Обнаружение новых мотивов связывания для идентификации последовательностей ДНК, обогащенных в выбранных областях, по сравнению со всем геномом проводили с использованием MEME-SUITE (https://meme-suite.org) в качестве алгоритма поиска мотива *de novo*.

Анализ онтологии генов. Для анализа генной онтологии использовали программу GREAT (http://great.stanford.edu/public/html) [14] и инструмент PANTHER overrepresentation test (http:// www.pantherdb.org) [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Связывание фактора PREP1 с хроматином в мезенхимальных стромальных клетках сердца

МСК получали из биоптатов эндомиокарда двух доноров (Био1, Био2), не имевших сердечнососудистых заболеваний, по методу, описанному



Рис. 1. Распределение локусов связывания PREP1 с ДНК в геноме мезенхимальных стромальных клеток сердца. *а* – Диаграммы Венна, показывающие распределения локусов связывания PREP1 в геноме МСК сердца, выделенных из биоптатов 1 (Био1) и 2 (Био2); цифрами показано число локусов; *б* – распределение локусов связывания PREP1 по расстоянию от старта транскрипции: менее 1 тыс.п.о. (ПРОМ), в интервале 1–50 тыс.п.о. (<50) и более 50 тыс.п.о. (>50).

ранее [13]. Суспензионную клеточную культуру получали обработкой биоптата раствором коллагеназы. Клетки высевали на культуральные чашки, адгезивные клетки собирали для последующих пассажей и, получив необходимое количество, использовали в экспериментах ChIP-seq. Для анализа профиля связывания фактора PREP1 с хроматином использовали поликлональные антитела против PREP1 [16]. Результаты секвенирования выложены в базу данных GEO под номером GSE160286.

Установлено, что PREP1 связывается с большим числом локусов в геноме человека: 27329 и 40 119 мест для Био1 и Био2 соответственно, что значительно больше их числа в клетках HeLa, как показано нами ранее [17]. Эти различия могут быть обусловлены особенностями трансформированных клеток HeLa, а также "глубиной" секвенирования. Важно, что полученные результаты согласуются с данными других авторов [18] по связыванию фактора РВХ1 – основного кофактора PREP1 – с ДНК. Расположение локусов связывания PREP1 в клетках двух биоптатов совпадало с точностью до 60% (рис. 1a), что свидетельствует о статистической значимости полученных данных. Дальнейшие исследования проведены на общих для двух биоптатов локусах связывания PREP1. В результате проведенного биоинформатического анализа их распределения в геноме выявлена низкая локализацию в промоторах генов – 18% на расстоянии менее 1 тыс.п.о. от старта транскрипции. Большинство участков связывания PREP1 располагается далеко от старта транскрипции: около 65% на расстоянии от 1 до 50 тыс.п.о. и около 18% на расстоянии больше 50 тыс.п.о. (рис. 16). Такой паттерн связывания PREP1 в геноме MCK сердца отличается от других исследованных типов клеток, для которых около половины локусов связывания

PREP1 расположено в промоторах [16, 17]. Среди генов, с которыми связывается PREP1, имеется значительное число генов-мишеней, идентифицированных нами ранее в других типах клеток [16].

Для определения расположения энхансеров в MCK сердца мы провели анализ ChIP-seq этих же клеток с использованием антител к модификации гистона H3 – H3K4me1, – которая считается маркером энхансеров [19]. В результате идентифицировано 135886 энхансерных элементов. Как видно из диаграммы, представленной на рис. 2*a*, большинство сайтов связывания PREP1 в геноме MCK сердца расположено в энхансерных элементах. Это косвенное свидетельство важной роли PREP1 в этих клетках.

Ассоциация полученных PREP1-содержащих энхансеров с генами проведена методом "ближайшего гена". Для определения возможной роли PREP1 в MCK сердца мы проанализировали онтологию тех генов, с регуляторными элементами которых связывается фактор PREP1. Для анализа регуляторные элементы разделили на 2 группы: промоторы (расположенные на расстоянии менее 1 тыс.п.о. от старта транскрипции) и идентифицированные нами энхансеры (табл. 1S, см. Дополнительные материалы). Результаты анализа генной онтологии представлены в табл. 1.

Число расположенных в энхансерах локусов ДНК, с которыми связывается PREP1, в 5 раз превышает связывание PREP1 с промоторами. Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что промоторные элементы в МСК сердца, с которыми связывается PREP1, регулируют базовые биохимические функции клеток, что согласуется с полученными нами ранее результатами [16]. В отличие от этого, энхансерные элементы регулируют процессы, необходимые для дифференцировки МСК в кардиомиоциты (сигнальный путь Wnt, диффе-



Рис. 2. Распределение энхансерных элементов, с которыми связывается PREP1 в геноме мезенхимальных стромальных клеток сердца. $a - Диаграммы Венна, показывающие число локусов связывания PREP1, располагающихся в энхансерах генома MCK сердца (H3K4Me1⁺); цифрами показано число локусов; <math>\delta$ – распределение локусов связывания PREP1 с энхансерными элементами по расстоянию от старта транскрипции: менее 1 тыс.п.о. (ПРОМ), в интервале 1– 50 тыс.п.о. (<50) и более 50 тыс.п.о. (>50).

ренцировка энтодермальных клеток, сигнальный путь рецептора фактора роста эндотелия сосудов. сигнальный путь рецептора трансформирующего фактора роста-бета, регуляция пролиферации гладкомышечных клеток), а также определяют морфологию кардиомиоцитов (регуляция формы клеток, положительная регуляция сборки стрессовых волокон, адгезия клеточного матрикса). Некоторые из них напрямую участвуют в развитии сердца и сосудов (развитие сердечного клапана, васкулогенез). Полный список категорий генной онтологии идентифицированных нами генов представлен в табл. 2S (см. Дополнительные материалы). Таким образом, связывание фактора PREP1 с ДНК в МСК сердца может быть одним из механизмов кардиомиоцитарной регуляции.

Исследование ДНК-фрагментов, связанных с PREP1, в хроматине MCK сердца

С целью определения мотивов связывания PREP1 с ДНК мы провели анализ коротких сайтов связывания PREP1 в промоторных областях, вне промоторных областей, а также в энхансерах MCK сердца. Как показано на рис. 3, в большинстве случаев (во всех трех группах элементов) PREP1 связывается с DECA-мотивами, что согласуется с ранее опубликованными данными [16]. Кроме того, наблюдается ассоциация с NFYмотивом, что дополнительно подтверждает показанное ранее свойство PREP1 образовывать комплексы с факторами NFY. В промоторных областях обнаружены сайты связывания SP-факторов транскрипции, для которых ранее выявлено связывание с промоторами TALE-факторов [20]. В энхансерных регуляторных элементах, а также в элементах, расположенных далеко от старта транскрипции, найдены мотивы ДНК, с которыми связывается АР1-комплекс, а значит можно предполагать и связывание с ними таких белков как Jun/Fos, что показано нами ранее [21].

В результате углубленного анализа мотивов энхансерных элементов, с которыми связывается PREP1, обнаружены сайты связывания SMAD, из чего можно предположить формирование здесь мультимерных комплексов факторов транскрипции, в которые вовлечен и PREP1.

Проведенное нами полногеномное исследование профиля связывания транскрипционного фактора PREP1 с хроматином MCK сердца выявило его возможную роль как в функционировании MCK сердца, так и кардиомиоцитов. Это позволяет предположить возможность использования этого фактора в методе прямого репрограммирования фибробластов в кардиомиоциты.

Таким образом, на МСК сердца человека нами проведен полногеномный анализ сайтов связывания ДНК с фактором PREP1, идентифицированы гены и биологические процессы, в регуляцию которых этот фактор может быть вовлечен, а также структурные мотивы ДНК, с которыми преимущественно связывается PREP1. На основании полученных результатов можно строить гипотезы о возможном составе комплексов, образуемых фактором транскрипции PREP1 на геномной ДНК. Нами обнаружено связывание PREP1 с генами, вовлеченными в вышеперечисленные процессы, из чего можно предполагать участии в них этого фактора.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ PREP1

GO – Биологический процесс (номер категории генной онтологии)	DR ^a	<i>p</i> -value	FDR
Промоторы		I	
Негативная регуляция ответа несвернутых белков ЭПР (GO:1900102)	4.14	6.94×10^{-4}	3.01×10^{-2}
Сигнальный путь ядер ЭПР ^ь (GO:0006984)	2.93	4.16×10^{-4}	1.93×10^{-2}
Убиквитинзависимый путь ERAD (GO:0030433)	2.65	1.19×10^{-5}	8.24×10^{-4}
Трансмембранный транспорт белков (GO:0071806)	2.41	7.66×10^{-4}	3.24×10^{-2}
Ответ несвернутых белков ЭПР (GO:0030968)	2.35	1.30×10^{-5}	8.90×10^{-4}
Сигнальный путь Smoothened (GO:0007224)	2.23	1.03×10^{-3}	4.10×10^{-2}
Положительная регуляция протеасомного катаболизма убиквитинза- висимых белков (GO:0032436)	2.21	2.36×10^{-4}	1.17×10^{-2}
Регуляция инициации трансляции (GO:0006446)	2.20	5.60×10^{-4}	2.49×10^{-2}
Регуляция мРНК-сплайсинга через сплайсосому (GO:0048024)	2.18	1.26×10^{-4}	6.79×10^{-3}
Положительная регуляция модификации гистонов (GO:0031058)	2.12	6.33×10^{-4}	2.77×10^{-2}
G2/М-переход митотического клеточного цикла (GO:0000086)	1.93	2.82×10^{-4}	1.36×10^{-2}
Энхансеры			
Негативная регуляция миграции гладкомышечных клеток (GO:0014912)	2.93	1.65×10^{-3}	4.29×10^{-2}
Сигнальный путь Wnt (GO:0007223)	2.84	9.51×10^{-5}	3.90E-03
Регуляция дифференцировки эндотелиальных клеток (GO:0045601)	2.47	1.41×10^{-3}	3.77×10^{-2}
Дифференцировка энтодермальных клеток (GO:0035987)	2.42	1.35×10^{-3}	3.65×10^{-2}
Формирование энтодермы (GO:0001706)	2.39	4.98×10^{-4}	1.58×10^{-2}
Регулирование проницаемости сосудов (GO:0043114)	2.35	1.15×10^{-3}	3.21×10^{-2}
Положительная регуляция сборки стресс-волокна (GO:0051496)	2.32	3.32×10^{-4}	1.12×10^{-2}
Клеточный ответ на стимулы фактора роста эндотелия сосудов (GO:0035924)	2.29	1.36×10^{-3}	3.67×10^{-2}
Положительная регуляция адгезии клеточного матрикса (GO:0001954)	2.23	6.23×10^{-4}	1.91×10^{-2}
Регулировка сборки фокальной адгезии (GO:0051893)	2.21	3.30×10^{-4}	1.12×10^{-2}
Сигнальный путь рецептора фактора роста эндотелия сосудов (GO:0048010)	2.16	2.50×10^{-4}	8.79×10^{-3}
Регуляция формы клеток (GO:0008360)	2.11	2.16×10^{-7}	1.69×10^{-5}
Сигнальный путь рецептора трансформирующего фактора роста-бета (GO:0007179)	2.06	4.36×10^{-5}	1.97×10^{-3}
Адгезия клеточного матрикса (GO:0007160)	2.05	6.39×10^{-6}	3.60×10^{-4}
Развитие сердечного клапана (GO:0003170)	2.05	1.73×10^{-3}	4.45×10^{-2}
Клеточный ответ на механическое воздействие (GO:0071260)	2.04	4.64×10^{-4}	1.50×10^{-2}
Васкулогенез (GO:0001570)	1.99	1.36×10^{-3}	3.67×10^{-2}
Регуляция пролиферации гладкомышечных клеток (GO:0048660)	1.94	3.06×10^{-5}	1.45×10^{-3}
Опосредованный интегрином сигнальный путь (GO:0007229)	1.94	3.41×10^{-4}	1.15×10^{-2}
Организация фибрилл коллагена (GO:0030199)	1.92	3.13×10^{-4}	1.07×10^{-2}
Регуляция миграции эндотелиальных клеток кровеносных сосудов (GO:0043535)	1.91	7.15×10^{-4}	2.16×10^{-2}
Регуляция эпителиально-мезенхимального перехода (GO:0010717)	1.89	1.05×10^{-3}	2.97×10^{-2}

Таблица 1. Анализ онтологии генов (GO), с которыми фактор PREP1 связывается в промоторах и энхансерах

^а Степень представленности (Degree of Representativeness). ^b ЭПР – эндоплазматический ретикулум.



Рис. 3. ДНК-мотивы связывания фактора PREP1 в промоторах генов (менее 1000 п.о. от старта транскрипции), вне промоторов и в энхансерах. Приведено процентное содержание связанных с PREP1 локусов ДНК с указанными мотивами для каждой группы от общего числа локусов соответствующей группы.

Авторы выражают признательность д-ру Елене Соммарива (Elena Sommariva) из Кардиологического центра Монзино (Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milan, Италия) за предоставленные нам клетки из биоптатов сердца, а также сотрудникам Genomics Unit (IFOM, Milan, Италия) за секвенирование образцов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках следующих научных проектов: "Механизмы участия гомеодоменсодержащих транскрипционных факторов в кардиомиоцитарной дифференцировке и репрограммировании фибробластов в кардиомиоциты" (№ 19-29-04112) и "Роль фактора Prep1 в получении и адипоцитарной дифференцировке индуцированных стволовых клеток" (№ 18-015-00465).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институтского комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Travers J.G., Kamal F.A., Robbins J., Yutzey K.E., Blaxall B.C. (2016) Cardiac fibrosis: the fibroblast awakens. *Circ. Res.* 118, 1021–1040.
- 2. Yoshida Y., Yamanaka S. (2017) Induced pluripotent stem cells 10 years later: for cardiac applications. *Circ. Res.* **120**, 1958–1968.
- 3. Kadota S., Shiba Y. (2019) Pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte transplantation for heart disease treatment. *Curr. Cardiol. Rep.* **21**, 73.
- 4. Nakamura K., Hirano K., Wu S.M. (2013) iPS cell modeling of cardiometabolic diseases. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 6, 46–53.

970

- 5. Tani H., Sadahiro T., Ieda M. (2018) Direct cardiac reprogramming: a novel approach for heart regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2629.
- Sadahiro T. (2019) Cardiac regeneration with pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and direct cardiac reprogramming. *Regen. Ther.* 11, 95–100.
- Chen Y., Yang Z., Zhao Z.A., Shen Z. (2017) Direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 118.
- Engel J.L., Ardehali R. (2018) Direct cardiac reprogramming: progress and promise. *Stem Cells Int.* 2018, 1435746.
- Stone N.R., Gifford C.A., Thomas R., Pratt K.J.B., Samse-Knapp K., Mohamed T.M.A., Radzinsky E.M., Schricker A., Ye L., Yu P., van Bemmel J.G., Ivey K.N., Pollard K.S., Srivastava D. (2019) Context-specific transcription factor functions regulate epigenomic and transcriptional dynamics during cardiac reprogramming. *Cell Stem Cell.* 25, 87–102.
- Blasi F., Bruckmann C., Penkov D., Dardaei L. (2017) A tale of TALE, PREP1, PBX1, and MEIS1: interconnections and competition in cancer. *Bioessays.* 39, 5.
- Longobardi E., Penkov D., Mateos D., De Florian G., Torres M., Blasi F. (2014) Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. *Dev. Dyn.* 243, 59–75.
- Fernandez-Diaz L.C., Laurent A., Girasoli S., Turco M., Longobardi E., Iotti G., Jenkins N.A., Fiorenza M.T., Copeland N.G., Blasi F. (2010) The absence of Prep1 causes p53-dependent apoptosis of mouse pluripotent epiblast cells. *Development*. 137, 3393–3403.
- Pilato C.A., Stadiotti I., Maione A.S., Saverio V., Catto V., Tundo F., Dello Russo A., Tondo C., Pompilio G., Casella M., Sommariva E. (2018) Isolation and characterization of cardiac mesenchymal stromal cells from endomyocardial bioptic samples of arrhythmogenic cardiomyopathy patients. *J. Vis. Exp.* 132, 57263.

- McLean C.Y., Bristor D., Hiller M., Clarke S.L., Schaar B.T., Lowe C.B., Wenger A.M., Bejerano G. (2010) GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat. Biotechnol.* 28, 495–501.
- Mi H., Muruganujan A., Thomas P.D. (2013) PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* 41, D377–D386.
- Penkov D., Mateos San M.D., Fernandez-Díaz L.C., Rosselló C.A., Torroja C., Sánchez-Cabo F., Warnatz H.J., Sultan M., Yaspo M.L., Gabrieli A., Tkachuk V., Brendolan A., Blasi F., Torres M. (2013) Analysis of the DNA-binding profile and function of TALE homeoproteins reveals their specialization and specific interactions with Hox genes/proteins. *Cell Rep.* 3, 1321–1333.
- Palmigiano A., Santaniello F., Cerutti A., Penkov D., Purushothaman D., Makhija E., Luzi L., di Fagagna F.D., Pelicci P.G., Shivashankar V., Dellino G.I., Blasi F. (2018) PREP1 tumor suppressor protects the late-replicating DNA by controlling its replication timing and symmetry. *Sci. Rep.* 8, 3198.
- Siersbæk R., Rabiee A., Nielsen R., Sidoli S., Traynor S., Loft A., Poulsen L.C., Rogowska-Wrzesinska A., Jensen O.N., Mandrup S. (2014) Transcription factor cooperativity in early adipogenic hotspots and super-enhancers. *Cell Rep.* 7, 1443–1455.
- 19. Kimura H. (2013) Histone modifications for human epigenome analysis. J. Hum. Genet. 58, 439–445.
- Völkel S., Stielow B., Finkernagel F., Berger D., Stiewe T., Nist A., Suske G. (2018) Transcription factor Sp2 potentiates binding of the TALE homeoproteins Pbx1:Prep1 and the histone-fold domain protein Nf-y to composite genomic sites. *J. Biol. Chem.* 293, 19250–19262.
- Dardaei L., Penkov D., Mathiasen L., Bora P., Morelli M.J., Blasi F. (2015) Tumorigenesis by Meis1 overexpression is accompanied by a change of DNA target-sequence specificity which allows binding to the AP-1 element. *Oncotarget.* 6, 25175–25187.

POSSIBLE ROLE OF PREP1 HOMEODOMAIN TRANSCRIPTION FACTOR IN CARDIAC MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Y. S. Stafeev¹, E. K. Shevchenko¹, M. A. Boldireva¹, and D. N. Penkov^{1, *}

¹ National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121552 Russia *e-mail: dpenkov@yahoo.com

Homeodomain transcription factors play a significant role in mesenchymal stromal cells (MSCs). Previously, the role of Meis1, Pbx1 and Prep1 proteins from the TALE (Three Amino acid Loop Extension) family in adipocytic and osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stromal cells was established. In this work, using ChIP-seq and bioinformatic analysis we investigated the binding pattern of PREP1 with the genomic DNA of human heart MSCs, identified nearby genes, and analyzed their ontology. The target genes of the PREP1 factor in cardiac MSCs have been established, and results obtained allow us to suppose involvement of the transcription factor PREP1 in the direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes.

Keywords: cardiomyocyte, mesenchymal stromal cells, transcription factor, PREP1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

РОU2F1(Oct-1) РАЗНОНАПРАВЛЕННО УЧАСТВУЕТ В АУТОРЕГУЛЯЦИИ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ПРОМОТОРОВ ЗА СЧЕТ СВЯЗЫВАНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ УЧАСТКАМИ ГЕНА *POU2F1*

© 2021 г. Е. В. Панкратова^{*a*, *}, Т. Н. Порцева^{*a*}, А. А. Макарова^{*a*}, Б. М. Льянова^{*a*}, С. Г. Георгиева^{*a*}, А. Г. Степченко^{*a*}

^а Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: pank@eimb.ru Поступила в редакцию 02.12.2020 г. После доработки 20.05.2021 г. Принята к публикации 25.05.2021 г.

Ген POU2F1, играющий важную роль в регуляции генома и развитии млекопитающих, имеет как убиквитарный, так и тканеспецифический промоторы и отличается сложной регуляцией. Нами идентифицированы участки гена POU2F1, содержащие множественные сайты связывания кодируемого им фактора транскрипции Oct-1. Межвидовая гомология в этих участках геномов человека. мыши, крысы, свиньи и собаки составляет более 90%, причем выявлена полная идентичность почти всех сайтов связывания белка Oct-1. Часть этих сайтов находится вблизи каждого из двух альтернативных промоторов гена POU2F1, тогда как другие обнаружены в 5'-некодирующей области гена на расстоянии 6 тыс.п.о. до старта транскрипции. Методами иммунопреципитации хроматина (ChIP) и задержки подвижности в геле комплека ДНК-белок (EMSA) выявлено присутствие Oct-1 на этих сайтах. Подавление экспрессии Oct-1 в клетках Namalwa с использованием технологии РНК-интерференции приводило к активации убиквитарного промотора U и ингибированию транскрипции с тканеспецифического промотора L, тогда как избыточная экспрессия Oct-1 давала обратный результат. Таким образом, выявлено, что в естественном контексте на убиквитарном промоторе U гена POU2F1 через низкоаффинные сайты связывания Oct-1. при повышении его концентрации в клетке, действует отрицательная обратная связь и одновременно на тканеспецифическом промоторе L через высокоаффинные канонические Oct-1-связывающие сайты (oct-сайты) действует положительная обратная связь.

Ключевые слова: транскрипционная ауторегуляция, *POU2F1*, фактор транскрипции, Oct-1 **DOI:** 10.31857/S0026898421060100

Oct-1 — один из важнейших регуляторных белков человека и других позвоночных, кодируемый геном *POU2F1*. Убиквитарный транскрипционный фактор Oct-1 и его тканеспецифические изоформы вовлечены в регуляцию основных клеточных процессов, таких как апоптоз, деление клеток, поддержание гомеостаза, ответ на стресс, синтез интерлейкинов и других медиаторов [1].

Количество белка Oct-1 в клетке критично для нормального клеточного роста и дифференцировки. Существенное повышение уровня экспрессии Oct-1 в норме наблюдается в эмбриогенезе [2], а у взрослых организмов высокий уровень экспрессии Oct-1 обнаружен в стволовых клетках [3]. Опухолевые стволовые клетки также характеризуются высоким содержанием Oct-1. Высокий уровень экспрессии Oct-1 в опухоли считается крайне неблагоприятным диагностическим признаком и коррелирует с высокой смертностью пациентов [4, 5]. Белок Oct-1 относится к проонкогенным факторам и имеет потенциальное прогностическое и терапевтическое значение. Анализ профилей экспрессии генов в опухолевых клетках показывает значительное увеличение экспрессии гена POU2F1 при раке желудка [4], колоректальном раке [5], инфильтрационном и поверхностном раке мочевого пузыря [6], раке молочной железы [7], глиобластоме, лимфоме Ходжкина, лимфоме тимуса и при меланоме [3]. Хіао и др. [8] показали, что при раке шейки матки концентрация Oct-1 в опухолевых клетках увеличивается почти в 6 раз по сравнению с нормальными клетками. Повышенные уровни мРНК Oct-1 обнаружены в опухолевых клетках плоскоклеточного рака головы и шеи по сравнению с нормальными кератиноцитами [9].

Транскрипция гена *POU2F1* регулируется двумя отдельными промоторами: U и L [10]. С промотора U экспрессируется убиквитарная изоформа Oct-1A, тогда как с промотора L – тканеспецифическая изоформа Oct-1L. Эти белки имеют различные N-концевые аминокислотные последовательности, что наводит на мысль о сложной системе регуляции экспрессии и функционирования белка Oct-1 [11, 12]. Индивидуальные функции субформ Oct-1 в клетке различаются [13]. Субформы Oct-1 могут играть особую роль в процессах, обеспечивающих дифференцировку и/или малигнизацию клеток [13, 14]. Ранее нами сообщалось о тканеспецифической регуляции транскрипции отдельных субформ Oct-1 [12].

Актуален вопрос о механизмах избирательной активации альтернативных промоторов и регуляции экспрессии субформ фактора транскрипции Oct-1 в различных популяциях нормальных и опухолевых клеток человека. Трудность решения этой задачи определяется тем, что генный локус *POU2F1* имеет сложное строение – с гетерогенным 5'-концом. Убиквитарный промотор U расположен в 5'-области гена *POU2F1*, тогда как тканеспецифический промотор L – в середине гена, на расстоянии 100 тыс.п.о. ниже промотора U. Механизмы активации или репрессии транскрипции с этих промоторов пока не изучены.

Нами показано существование высокоаффинных и низкоаффинных сайтов связывания для Oct-1 в регуляторных областях гена *POU2F1*, из чего можно сделать вывод о возможной ауторегуляции этого гена.

Ауторегуляция — важный механизм поддержания необходимого уровня транскрипции жизненно важных для клетки генов [15]. Ауторегуляция необходима для того, чтобы ограничить колебания в числе копий данного белка в клетке, а утрата этого механизма для некоторых генов в опухолях человека способствует онкогенезу [16]. Ранее нами показано [12], что в некоторых опухолевых линиях клеток активируется транскрипция тканеспецифической изоформы Oct-1L, которую в норме в клетках такого же тканевого происхождения не регистрируют. Из этого следует, что активация промотора L может коррелировать со злокачественным перерождением клеток.

Теперь нами показано, что опухолевым линиям клеток Namalwa и HeLa присущ сложный механизм ауторегуляции гена *POU2F1*; при этом ауторегуляция может быть как положительной, так и отрицательной — в зависимости от промотора, с которого реализуется транскрипция. Обнаружены эволюционно консервативные последовательности в 5'-некодирующей области и в областях двух альтернативных промоторов гена *POU2F1*, которые содержат множественные сайты связывания белка Oct-1. Нокдаун *POU2F1* в клетках Namalwa приводит к активации убиквитарного промотора U

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

и подавлению транскрипции с тканеспецифического промотора L, в то время как сверхэкспрессия — к обратному результату. Таким образом, в опухолевых линиях клеток ауторегуляция убиквитарного промотора гена *POU2F1* происходит по принципу отрицательной обратной связи, а тканеспецифического промотора по принципу положительной обратной связи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии. В работе использованы следующие опухолевые линии клеток человека: Namalwa (лимфома Беркитта) и HeLa – из Коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в полной среде DMEM ("GIBCO, Thermo Fisher Scietific", США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; "HyClone", США), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

Нокдаун и сверхэкспрессия гена POU2F1. Для нокдауна гена POU2F1 использовали технологию РНК-интерференции. На основе лентивирусного вектора pGPV.ma4 были созданы конструкции для синтеза коротких РНК со шпилечной структурой (shPHK): scrambled (scr) (контрольная) и anti-POU2F1 (shPHK для нокдауна тотальной мРНК всех изоформ Oct-1) ("Евроген", Россия), которыми трансфицировали клетки НЕК-293 и получали соответствующие лентивирусные стоки. Клетки Namalwa (10⁶ клеток) трансдуцировали полученными лентивирусными частицами. После селекции, проведенной пуромицином, получили линии клеток Namalwa со стабильным нокдачном гена POU2F1 и контрольную линию клеток Namalwa (scrambled).

Для РНК-интерференции использована shPHK к мPHK Oct-1 (анти-*POU2F1*): 5'-GATCCGC-CAAGACCTTCAAACAAATTCAAGAGATTTGTTT-GAAGGTCTTGGCT-TTTTTG-3' – и shPHK-scr (нуклеотидная последовательность, не имеющая гомологии с PHK человека) в качестве отрицательного контроля: 5'-GATCCGCAAAAAT-TCTCCGAACGTGT-TCAAGAGACACGTTCG-GAGAATTTTTGT-TTTG-3'.

Конструкции pL-Oct-1A-3FLAG, pL-Oct-1L-3FLAG, pL-Oct-1X-3FLAG были созданы путем встраивания копии кодирующих последовательностей Oct-1 человека в вектор pLenti6/V5-D-TOPO ("Invitrogen", США) [13]. Для стабильной трансдукция клеток использовали систему лентивирусной экспрессии ViraPower ("Invitrogen") согласно протоколу производителя. Для селекции и поддержания стабильной трансформации использовали бластицидин. Уровень экспрессии *POU2F1* и Oct-1 измеряли с использованием количественной ПЦР и иммуноблотинга. В работе использованы поликлональные кроличьи антитела к белку Oct-1, полученные ранее в нашей лаборатории [13], кроличьи поликлональные антитела против Oct-1 (Ab66132; "Abcam", Великобритания), мышиные моноклональные анти-FLAG-антитела (F9291; "Sigma-Aldrich", США), мышиные моноклональные антитела против Lamin B1 (sc-377000; "Santa Cruse Boitechnology", США), кроличьи поликлональные антитела против фосфо-PHK-полимеразы II (Phospho RNA PolII (S5); Ab240740; "Abсат") и кроличьи поликлональные антитела против β-актина (Ab6276; "Abcam").

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени (количественная ОТ-ПЦР). Для очистки РНК из клеточных линий использовали TRIzol Reagent ("Ambion", США). Обратную транскрипцию проводили с помощью набора Maxima First Strand DNA Synthesis ("Thermo Fisher Scientific", США), для количественной ОТ-ПЦР использовали набор qPCRmix-HS-SYBR ("Евроген"). Условия реакции амплификации для количественной ПЦР: 2 мин при 95°С и 45 циклов: 30 с при 95°С, 30 с при 60°С, 30 с при 72°С. Для проведения ПЦР на кДНК полноразмерного транскрипта гена POU2F1 использовали ДНКполимеразу DyNAzyme EXT и буфер, рекомендованный производителем ("Thermo Fisher Scientific"). Условия реакции амплификации: 4 мин при 95°C, затем 28 циклов: 30 с при 95°C, 1 мин при 62°С, 2 мин 30 с при 72°С. Для определения уровня мРНК Oct-1 использовали следуюшие праймеры:

Oct-1A-F: 5'-TATTCAAAATGGCGGACGGA-3'; Oct-1L-F: 5'-CCACCCCAAACTGCTACCTGT-3'; Oct-1X-F: 5'-CAGCACGATTTGTTGGATGTG-3'; Oct-1-R: 5'-GTTTCTGACGGATTGTTCATTC-3'.

Уровни мРНК Oct-1 нормализовали к уровню мРНК глюкоронидазы (GUSB), для чего использовали следуюшие праймеры:

GUS-F: 5'-CGTGGTTGGAGAGCTCATTTG-GA-3' и GUS-R: 5'-ATTTCCCCAGCACTCTC-CGTCGGT-3'.

Иммунопреципитация хроматина (ChIP). В одной реакции иммунопреципитации использовали хроматин, выделенный из 3×10^6 клеток Namalwa или HeLa. "Сшивку" проводили, добавляя к клеткам, ресуспендированным в PBS, формальдегид до концентрации 0.8% с последующей инкубацией в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением буфера 2.5 М глицин-HCl (pH 6.0) до концентрации 0.125 М (1/20 от общего объема). После отмывки тремя объемами холодного раствора PBS хроматин ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ НЕРЕЅ-КОН (pH 7.9), 140 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1% тритона X-100, 0.1% дезоксихолата натрия, 0.1% SDS, коктейль протеаз ("Roche", Швейцария), "дробили" ультразвуком до фрагментов размером ~500 нуклеотидов и центрифугировали дважды при $16000 \times g$ в течение 20 мин, отбирали супернатант (растворимую фракцию хроматина), фасовали и замораживали в жидком азоте.

Хроматин (100 мкг в пересчете на ДНК) предварительно инкубировали с 10 мкг IgG неиммунизированного кролика в течение 2 ч при 4°C, вносили 20 мкг Protein-A-сефарозы ("Sigma-Aldrich") и инкубировали еще 1 ч при перемешивании. Неспецифические комплексы, связанные с Protein-A-сефарозой, осаждали (2000 × g, 2 мин, 4°C). Супернатант использовали для иммунопреципитации хроматина.

Стандартная реакционная смесь для иммунопреципитации хроматина содержала 100 мкг хроматина, 10 мкг антител к Oct-1, а также 1 мг/мл ДНК спермы лосося и 1 мг/мл BSA. Иммунопреципитацию проводили при 4°С в течение ночи, затем добавляли 15 мкл Protein-А-сефарозы и инкубировали 2 ч при 4°С на ротаторе. После центрифугирования при $(2000 \times g, 2 \text{ мин}, 4^{\circ}\text{C})$ супернатант удаляли и промывали сефарозу последовательно следующими буферами: RIPA с 0.5 М NaCl, LiCl-буфером (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA, 250 мМ LiCl, 0.5% дезоксихолат натрия) и дважды ТЕ (10 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA). Элюцию связавшихся с Protein-Aсефарозой ДНК-белковых комплексов проводили в буфере TSE (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1% SDS, 1 мМ EDTA) в течение 20 мин при покачивании при комнатной температуре. Сефарозу осаждали центрифугированием при 2000 × g в течение 2 мин. К супернатанту добавляли 5 М NaCl до концентрации 150 мМ и инкубировали смесь при 65°С в течение 16 ч при перемешивании (процедура "расшивки" хроматина).

После расшивки хроматин обрабатывали протеазой К (3 мкл 20 мг/мл протеиназы К, 5 мкл 0.5 М ЕDTA на 500 мкл реакционной смеси) в течение 4 ч при 55°С при перемешивании. ДНК экстрагировали смесью фенол—хлороформ, осаждали спиртом, осадок суспендировали в буфере ТЕ. Полученную ДНК анализировали методом количественной ПЦР и определяли соотношение осажденной/исходной фракции (%). Каждое измерение выполняли как минимум в трех повторах и вычисляли среднее значение. Для количественной ПЦР использованы следующие праймеры:

Py-F1: 5'-AGGGTTGGAAGGGTTTGCCTA-3' PY-R1: 5'-TCCCCAGTCCAATAACTGCAA-3' Py-F2: 5'-TTTCAAAAGCATAATGCAGTGGTG-3' Py-R2: 5'-TGTTTGAATTCCATCTTGGCCCT-3' Py-F3: 5'-TGATGTGAGCAACTTCCCTTG-3' Py-R3: 5'-ATGATAATGTTTTTCCTGGAATGGA-3' A-prom-F: 5'-AGTCAAGATGAGAGTTCAGCCG-3' A-prom-R: 5'-AGCCGGGGTTGAGTATGA-3' L-prom-F1: 5'-TCCCTTCATGCACTGCCAAT-3' L-prom-R1: 5'-ACTGAAAGCACTCCCTGCAT-3' L-prom-F2: 5'-GCAGGGAAGGAGGAAGCAT-3' L-prom-R2: 5'-AGAGCTAGTCACAGGGAGGG-3' Oct-1-exon 15-F: 5'-CAGTGAGACCAGCACAACACA -3' Oct-1-exon 15-R: 5'-CTCCACCTCAGACGTGAATGAGAT-3' CD3-5': 5'-AGTGAGCCCCTTCAAGATACCTAT-3' CD3-3': 5'-TTCGATAATGAACTTGCACGG-3'

Клонирование и очистка POU-домена Oct-1. POU-домен клонировали в модифицированной плазмиде pET30b, содержащей на 5'-конце полилинкера последовательность ДНК, которая соответствует 6 остаткам гистидина в рамке считывания с POU-доменом. Наработку и очистку белка 6×His-POU проводили по протоколу фирмыпроизводителя ("QIAGEN", Германия).

Анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA). Связывание [³²P]-меченых олигонуклеотидов с POU-доменом Oct-1 проводили в 20 мкл буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl, pH 7.8, 1 мМ EDTA, 60 мМ KCl, 1 мМ DTT, 200 мкг/мл BSA, 0.5 нг меченого олигонуклеотида и 10–30 нг ДНК-связывающего POU-домена Oct-1. Реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего 15 мкл наносили на 6%-ный ПААГ. В качестве контроля использовали олигонуклеотиды: oct (5'-ATGCAAAT), PORE (5'-ATTTGAAATG-CAAAT) и MORE (5'-ATGCATATGCAT). Использовали следующие двухцепочечные олигонуклеотиды, соответствующие регуляторным областям гена *POU2F1* (сайты связывания белка Oct-1 выделены прописными буквами):

- L1: 5'-atcctcctaattattATGCTGGCactcaggagataattt-3'
- L2: 5'-caattaatATGCAAATagcctgataaatatttatgcaacg-3'
- L3: 5'-taacgaggagagATTTGCATaaggccctaat-3'
- L4: 5'-ggaaagcATTTGCAAagcacaagcttacttgaATTTGCAGtag-3'
- PV1: 5'-gtcaaagggttggaaggGTTTGCCTaggaatgagtgcg-3'
- PV2: 5'-gtaatgcagtggtgtataaaatttaataatgtataaaacttgttATGGAAATt-3'
- PV3: 5'-gtttcctaaaATAAGCATtatcatatacagagaagactggaaatc-3'.

Статистический анализ. Сравнение экспериментальных групп проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Все данные представлены в виде среднего значения \pm стандартного отклонения (SD), рассчитанных на основании не менее трех независимых экспериментов. Различия считались статистически значимыми при P < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Oct-1 взаимодействует с регуляторными областями гена POU2F1

Ген *POU2F1* человека расположен на хромосоме 1, его длина составляет 212 тыс.п.о. Этот ген содержит убиквитарный промотор U и тканеспецифический промотор L (рис. 1*a*). С целью понять возможные механизмы регуляции транскрипции гена *POU2F1* мы провели сравнительный анализ нуклеотидной последовательности генов *POU2F1* человека, мыши, свиньи и собаки и идентифицировали в них эволюционно консервативные некодирующие области.

В 5'-области гена POU2F1 обнаружено несколько участков высокой межвидовой гомологии (>90%), две из которых находятся в областях промоторов U и L (рис. 1*a*). Кроме того, на расстоянии 6 тыс.п.о. в 5'-области от старта транскрипции промотора U обнаружено три участка с высокой гомологией (>90%) между сравниваемыми видами. Эти возможные регуляторные участки обозначены далее как РУ1, РУ2 и РУ3. В результате проведенного сравнительного анализа выявлено, что их нуклеотидные последовательности содержат множественные сайты связывания Oct-1. включая PORE. MORE и канонические Oct-1-связывающие сайты, oct-сайты, (ATGCAAAT) и oct-подобные сайты с единичными нуклеотидными заменами. Эти сайты оказались идентичны у сравниваемых видов (рис. 1a), а их положение в геноме человека, на хромосоме 1, указано в табл. 1. Мы предполагаем. что консервативные oct- и oct-подобные сайты регуляторных областей гена POU2F1 могут участвовать в ауторегуляции этого гена [17].

Влияние Oct-1 на экспрессию гена *POU2F1* исследовано нами в двух культурах клеток: HeLa и Namalwa. В клетках Namalwa оба промотора активны (рис. 16, e), в то время как в клетках HeLa работает только U-промотор, что подтверждается как отсутствием тканеспецифического транскрипта (рис. 16), так и отсутствием PHK-полимеразы II (Phospho S5) на промоторе L в клетках HeLa (рис. 1e).

Связывание Oct-1 с идентифицированными консервативными областями гена *POU2F1* проанализировано методом ChIP. Из полученных результатов следует, что белок Oct-1 взаимодействует с *oct*-сайтами, расположенными в промоторах U и L, а также с предполагаемыми регуляторными участками PV1, PV2 и PV3, расположенными в 5'-области гена. Взаимодействие с этими участками обнаружено как в клетках HeLa, так и Namalwa. Интересно, что в клетках HeLa Oct-1 присутствует на промоторе L, который по нашим данным неактивен в этих клетках.

Возможные сайты связывания Oct-1, идентифицированные методом ChIP, проанализированы методом EMSA (рис. 2*a*, *б*). Взаимодействие Oct-1 с ДНК исследовали, используя аффинно очищенный ДНК-связывающий POU-домен белка Oct-1 и ДНК-зонды, идентичные геномной последовательности регуляторных участков *POU2F1*. Несмотря на то, что последовательность PУ1 содержит две замены в *oct*-сайте (<u>G</u>TTTGC<u>C</u>T), она образует мономерный комплекс с POU-доменом. В участке РУ2 обнаружен только один *oct*-подобный сайт (ATGGAAAT), однако POU-домен образует мультимерные комплексы с этим зондом. С PУЗ POU-домен образует моно-, ди- и тримерные комплексы. Таким образом, сайты связывания Oct-1, идентифицированные методом ChIP и сравнительного анализа геномов млекопитающих, взаимодействуют с POU-доменом белка Oct-1.

При низкой концентрации Oct-1 взаимодействует только с высокоаффинными сайтами, при этом, независимо от типа последовательности (oct, PORE или MORE), формируются преимущественно мономерные комплексы; при повышении концентрации Oct-1 на сайтах PORE и MORE образуются димеры белка Oct-1 (рис. 2*a*).

РОU-домен белка Oct-1 состоит из двух ДНКсвязывающих субломенов: POU-специфического (POUsp) и POU-гомеодомена (POUh), - соединенных гибким аминокислотным линкером. РОU-домен обладает такой же ДНК-связывающей активностью и специфичностью, как и полноразмерный белок Oct-1. В силу позиционной лабильности двух ДНК-узнающих РОU-субдоменов Oct-белки могут взаимодействовать с очень вырожденными ДНК-последовательностями, не содержащими канонических сайтов связывания. Формирование димеров и мультимеров на этих сайтах (рис. 2a) зависит как от нуклеотидной последовательности самого сайта, так и от концентрации Oct-1. Таким образом, повышение содержания белка Oct-1 в клетке может приводить к расширению спектра ДНК-сайтов, изменению конформации Oct-1 за счет его димеризации на этих сайтах и к изменению репертуара регулируемых генов.

Таким образом, показано, что Oct-1 связывается с областями как убиквитарного, так и специфического промоторов гена *POU2F1*. Большое число сайтов связывания Oct-1 и их высокая межвидовая консервативность в областях альтернативных промоторов позволяет предположить, что ауторегуляция транскрипции гена *POU2F1* достаточно сложная, а повышение концентрации белка Oct-1 в клетке может приводить к изменению характера его взаимодействия с ДНК-мишенями и изменению транскрипционной активности регулируемых генов-мишеней.

Понижение уровня Oct-1 в клетке вызывает активацию транскрипции с U-промотора и снижение транскрипции с L-промотора гена POU2F1

С целью изучения ауторегуляции гена *POU2F1* в клетках Namalwa проведен нокдаун *POU2F1* с помощью shPHK. В этих клетках активны оба промотора гена *POU2F1* (U и L) и Oct-1, как показано, присутствует на обоих промоторах. Нокдаун приводит к снижению уровня мPHK Oct-1L, транскрибируемой с тканеспецифического L-про-



Рис. 1. Осt-1 взаимодействует с регуляторными областями гена *POU2F1. а* – Схема гена *POU2F1* человека и расположение в регуляторных областях сайтов связывания Oct-1. Сравнение с геном *POU2F1* других млекопитающих. Сайты связывания Oct-1 обозначены звездочками. Области высокой межвидовой гомологии (>90%) выделены светло-серым цветом. Стрелками показано положение праймеров, использованных в ПЦР для анализа продуктов ChIP. δ – Экспрессия мPHK Oct-1 изоформ A и 1L в клетках линий HeLa и Namalwa по результатам полноразмерной OT-ПЦР. e – Присутствие транскрипционно активной PHK-полимеразы II (Phospho S5) на убиквитарном (U) и тканеспецифическом (L) промоторе гена *POU2F1* в клетках линий HeLa и Namalwa по результатам ChIP-анализа. e – Распределение белка Oct-1 в регуляторных областях гена *POU2F1* в клетках линий HeLa и Namalwa по результатам ChIP-анализа. e – Распределение белка Nct-1 в регуляторных областях гена *POU2F1* в клетках линий HeLa и Namalwa по результатам ChIP-анализа. e – Распределение ском (L) промоторе гена *POU2F1* в клетках линий HeLa и Namalwa по результатам ChIP-анализа. e – Распределение белка Nct-1. Стрелками на рисунке (a) обозначено положение олигонуклеотидов, использованных для анализа ChIP. *P < 0.05, **P < 0.01.

ПАНКРАТОВА и др.



Рис. 2. Анализ взаимодействия POU-домена белка Oct-1 с канонической *oct*-последовательностью и с неканоническими ДНК-последовательности из энхансерной (*a*) и промоторной (промотор L) (*b*) областей гена *POU2F1* методом EMSA. Обозначения: *1* – в реакцию добавлено 60 нг аффинно очищенного POU-домена; *2* – в реакцию добавлено 20 нг аффинно очищенного POU-домена.

мотора, и к одновременному усилению транскрипции с U-промотора (рис. 3). На основании этих данных можно сделать вывод, что механизмы, задействованные в регуляции этих двух промоторов, различны, причем снижение уровня Oct-1 в клетке приводит к активации убиквитарного промотора U.

Повышение уровня Oct-1 в клетке ингибирует транскрипцию с U-промотора и активирует транскрипцию с промотора L

Проанализировано связывание изоформ Oct-1A и Oct-1L с *oct*-сайтами промоторов U и L гена

POU2F1. Методом ChIP показано, что при сверхэкспрессии Oct-1A или Oct-1L в клетке на промоторах U и L повышается содержание белка Oct-1 (рис. 4*a*).

Показано, что повышение концентрации Oct-1 в клетке влияет на транскрипцию с промоторов U и L (рис. 46). Так, сверхэкспрессия Oct-1 в клетках Namalwa приводила к подавлению транскрипции с промотора U и одновременно к активации транскрипции с промотора L. Таким образом, изменение концентрации белка Oct-1 в клетке вызывает разнонаправленное изменение транскрипции с альтернативных промоторов гена *POU2F1*.

Регуляторный участок ^а	Геномные координаты, хромосома 1 человека (RCh38.p13)	Нуклеотидная последовательность, b $5' \rightarrow 3'$
L1	167 328 704 167 328 741	atcctcctaattattATGCTGGCactcaggagataattt
L2	167328760-167328799	caattaatATGCAAATagcctgataaatatttatgcaacg
L3	167328879-167328910	taacgaggagagATTTGCATaaggccctaat
L4, L5	167329443-167329485	ggaaagcATTTGCAAagcacaagcttacttgaATTTGCAGtag
U1	167220972-167220996	Cattttacatattcatattcatact
U2	167221026-167221037	Gacttagcataa
РУ1	167207453-167207485	gacaaagggttggaaggGTTTGCCTaggaatga
РУ2	167207757 - 167207808	taatg cagtggtgtataaaaatttaataatgtataaaaacttgttATGGAAATt
РУ3(1)	167208074 - 167208117	tttcctaaaATAAGCATtatcatatacagagaagactggaaatc
РУ3(2)	$167208135 {-}167208172$	cttcccttgattatgacaggaagcCTGCATATataatc

Таблица 1. Участки связывания белка Oct-1 в регуляторных областях гена POU2F1 человека

^а Положение регуляторных участков указано на рис. 1*а*. ^b Сайты связывания Oct-1 выделены прописными буквами.



Puc. 3. Нокдаун *POU2F1* приводит к активации транскрипции с промотора U и одновременно к подавлению транскрипции с промотора L. *a* – Изменение уровня мPHK Oct-1 в клетках Namalwa при нокдауне *POU2F1* под действием shPHK anti-*POU2F1* (Nam-anti-*POU2F1*), нацеленной на все транскрипты *POU2F1*, по сравнению с уровнем в клетках с shPHK-scr (Nam-scr). Экспрессию гена *POU2F1* под контролем промоторов U и L оценивали методом количественной OT-ПЦР с использованием олигонуклеотидов, специфичных к 5'-концам убиквитарного или тканеспецифического транскрипта Oct-1. *б* – По результатам иммуноблотинга с антителами к Oct-1 нокдаун *POU2F1* приводит к снижению уровня белка Oct-1 в клетках Namalwa. Контроль нанесения образцов проведен с антителами к ламину B. На дорожки нанесено по 10 мкг клеточного экстракта. *P < 0.05, **P < 0.01.



Puc. 4. Избыточная экспрессия Oct-1 приводит к активации транскрипции с промотора L и одновременно к подавлению транскрипции с промотора U гена *POU2F1. a* – ChIP-анализ изоформ Oct-1A или Oct-1L в клетках Namalwa при сверхэкспрессии Oct-1. При сверхэкспрессии изоформ Oct-1A и Oct-1L в клетках Namalwa есерхэкспрессии Oct-1 на промоторах гена *POU2F1. б* – Влияние сверхэкспрессии Oct-1 на транскрипцию с альтернативных промоторов reна *POU2F1* в клетках Namalwa: нормальная (Nam) и повышенная экспрессия (Nam-Oct-1). Уровень транскриптов с U- и L-промоторов измеряли методом количественной OT-ПЦР. ПЦР проводили с использованием олигонуклеотидов, специфичных к 5'-концам убиквитарного или тканеспецифического транскрипта Oct-1. В клетках Namalwa сверхэкспрессии Oct-1A и Oct-1X [13], на 5'-конце мРНК которой отсутствуют участки, специфичные для изоформ Oct-1A и Oct-1L, поэтому методом ПЦР определяется присутствие только эндогенных изоформ. *в* – Вестерн-блот-анализ сверхэкспрессии Oct-1 в клетках Namalwa с использованые матител к Oct-1. На дорожки нанесено по 10 мкг клеточного экстракта. β-актин и соответствующие антитела использованы для контроля нанесения образцов Результаты по сверхэкспрессии изоформ Oct-1 в клетках Namalwa детально представлены нами ранее [13]. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного исследования на примере двух клеточных линий различного тканевого происхождения показано, что белок Oct-1 взаимодействует с регуляторными областями гена *POU2F1* и вовлечен в ауторегуляцию двух альтернативных промоторов. Чрезвычайно высокая межвидовая гомология в регуляторных областях гена *POU2F1* и полная идентичность сайтов связывания Oct-1 в альтернативных промоторах и в отдаленной 5'-области – признак большой значимости ауторегуляции гена *POU2F1* в поддержании клеточного гомеостаза.

Убиквитарный промотор U расположен в 5'-области гена *POU2F1*, тогда как тканеспецифический промотор L расположен в середине гена, на 100 тыс.п.о. ниже промотора U. Механизм тканеспецифической активации или репрессии транскрипции промоторов U и L пока не выяснен. Во всех клетках человека идет транскрипция с убиквитарного промотора U. В норме промотор L активен только в клетках лимфоидного ряда и в мозге [13]. Ранее нами показано, что в некоторых опухолевых линиях клеток начинается активация промотора L, тогда как в нормальных клетках такого же тканевого происхождения этот промотор "молчит" [14]. Таким образом, активация промотора L может коррелировать со злокачественной трансформацией клеток. Ранее методом направленного мутагенеза и транзиентной трансфекции нами показано, что в системе *in vitro* промотор L гена *POU2F* ауторегулиремый [18].

Однако до сих пор нет полного понимания механизмов регуляции генов в естественном контексте, а это важно с точки зрения выяснения вклада множества геномных элементов в контроль генной экспрессии. Здесь нами обнаружено, что в естественном контексте на убиквитарном промоторе U гена *POU2F* действует отрицательная обратная связь — через низкоаффинные сайты связывания Oct-1 при повышении его концентрации в клетке и одновременно на тканеспецифическом промоторе L действует положительная обратная связь через высокоаффинные канонические *oct*-сайты.

Ауторегуляция — важный механизм поддержания необходимого уровня транскрипции генов "домашнего хозяйства" клетки. В ауторегуляции гена POU2F1 реализуются два разнонаправленных механизма: отрицательная обратная связь и положительная обратная связь, причем не только через промоторы, но и через регуляторные участки в 5'-области гена, расположенные на значительном расстоянии от убиквитарного промотора. Такой механизм "разнонаправленной" ауторегуляции свидетельствует о том, что, во-первых, Oct-1 участвует в тонкой настройке регуляции собственной транскрипции и, во-вторых, что залача направленного понижения количества белка Oct-1 в опухолевой клетке – функция с несколькими переменными.

Белок Oct-1 экспрессируется на относительно постоянном уровне в каждом типе клеток. Повышение уровня белка Oct-1 в клетке приводит к нарушению клеточного гомеостаза, развитию эффекта Варбурга, изменению скорости деления клеток [13]. Таким образом, повышение уровня Oct-1 может приводить к малигнизации клеток. В работах последних нескольких лет появляется все больше фактов о роли Oct-1 как проонкогенного фактора для ряда эпителиальных и других опухолей [19-21]. Важно отметить, что те опухоли, в которых повышен уровень экспрессии Oct-1, гораздо хуже поддаются лечению и их развитие связано с крайне неблагоприятным прогнозом для пациента [22]. На основе полученных нами результатов можно предполагать, что повышение уровня белка Oct-1 при злокачественной трансформации клеток приводит к расширению спектра ДНК-сайтов, изменению конформации белка Oct-1 за счет его димеризации на этих сайтах и, как следствие, к изменению набора регулируемых им генов. Анализ взаимодействия Oct-1 с ДНК важен для понимания протуморогенного эффекта высоких концентраций Oct-1 в опухолевых клетках. В некоторых исследованиях выявлена положительная корреляция между высоким уровнем белка Oct-1 в злокачественных опухолях и низкой выживаемостью больных [8, 9, 21]. Так, уровень экспрессии Oct-1 в опухолях J. Qian и соавт. [21] считают более надежным прогностическим параметром, чем стадирование по шкале American Joint Committee on Cancer (AJCC) при раке желудка.

Понимание механизмов регуляции экспрессии гена *POU2F1* на транскрипционном уровне необходимо для идентификации регуляторных путей, которые могут стать мишенями новых лекарственных препаратов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00365).

Статья не содержит экспериментов с привлечением животных или людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Kang J., Shakya A., Tantin D. (2009) Stem cells, stress, metabolism and cancer: a drama in two Octs. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 491–499.
- Veenstra G.J., Beumer T.L., Peterson-Maduro J., Stegeman B.I., Karg H.A., van der Vliet P.C., Destrée O.H. (1995) Dynamic and differential Oct-1 expression during early *Xenopus* embryogenesis: persistence of Oct-1 protein following down-regulation of the RNA. *Mech. Dev.* 50, 103–117.
- Vázquez-Arreguín K., Tantin D. (2016) The Oct1 transcription factor and epithelial malignancies: old protein learns new tricks. *Biochim. Biophys. Acta.* 1859, 792–804.
- Chen X., Leung S.Y., Yuen S.T., Chu K.M., Ji J., Li R., Chan A.S., Law S., Troyanskaya O.G., Wong J., So S., Botstein D., Brown P.O. (2003) Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Mol. Biol. Cell.* 14, 3208–3215.
- Wang Y.P., Song G.H., Chen J., Xiao C., Li C., Zhong L., Sun X., Wang Z.W., Den G.L., Yu F.D., Xue Y.M., Tang H.M., Peng Z.H., Wang X.L. (2016) Elevated OCT1 participates in colon tumorigenesis and independently predicts poor prognoses of colorectal cancer patients. *Tumour Biol.* 37, 3247–3255.
- Sanchez-Carbayo M., Socci N.D., Lozano J., Saint F., Cordon-Cardo C. (2006) Defining molecular profiles of poor outcome in patients with invasive bladder cancer using oligonucleotide microarrays. *J. Clin. Oncol.* 24, 778–789.
- Finak G., Bertos N., Pepin F., Sadekova S., Souleimanova M., Zhao H., Chen H., Omeroglu G., Meterissian S., Omerogl A., Hallett M., Park M. (2008) Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat. Med.* 14, 518–527.
- Xiao S., Liao S., Zhou Y., Jiang B., Li Y., Xue M. (2014) High expression of octamer transcription factor 1 in cervical cancer. *Oncol. Lett.* 7, 1889–1894.
- 9. Sharpe D.J., Orr K.S., Mora M., White, S. J., McQuaid S., Lappin T.R., Thompson A., James J.A.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

(2014) POU2F1 activity regulates HOXD10 and HOXD11 promoting a proliferative and invasive pheno-type in head and neck cancer. *Oncotarget.* **5**, 8803–8815.

- Pankratova E.V., Sytina E.V., Luchina N.N., Krivega I.V. (2003) The regulation of the Oct-1 gene transcription is mediated by two promoters. *Immunol. Lett.* 88, 15–20.
- 11. Sytina E.V., Pankratova E.V. (2003) Oct-1 transcription factor plasticity and polyfunctionality. *Mol. Biol.* (*Mosk.*). **37**, 755–767.
- 12. Luchina N.N., Krivega I.V., Pankratov E.V. (2003) Human Oct-1L isoform has tissue-specific expression pattern similar to Oct-2. *Immunol. Lett.* **85**, 237–241.
- Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Portseva T., Mogila V.A., Georgieva S.G. (2016) Different N-terminal isoforms of Oct-1 control expression of distinct sets of genes and their high levels in Namalwa Burkitt's lymphoma cells affect a wide range of cellular processes. *Nucleic Acids Res.* 44, 9218–9230.
- Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Krylova I.D., Portseva T.N., Georgieva S.G. (2018) The regulatory interplay between Oct-1 isoforms contributes to hematopoiesis and the isoforms imbalance correlates with a malignant transformation of B cells. *Oncotarget.* 9, 29892–29905.
- 15. Pinson J., Simpson T.I., Maso J.O., Price D.J. (2006) Positive autoregulation of the transcription factor Pax6 in response to increased levels of either of its major isoforms, Pax6 or Pax6(5a), in cultured cells. *BMC Dev. Biol.* **6**, 25.
- Facchini L.M., Chen S., Marhin W.W., Lear J.N., Penn L.Z. (1997) The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter. *Mol. Cell. Biol.* 17, 100–114.

- Степченко А.Г., Георгиева С.Г., Панкратова Е.В. (2019) Множественный характер взаимодействия транскрипционного фактора Oct-1 (POU2F1) с последовательностями PORE и MORE. *Мол. биология.* 53, 430–435.
- Pankratova E., Sytina E., Polanovsky O. (2006) Autoregulation of Oct-1 gene expression is mediated by two octa-sites in alternative promoter. *Biochimie*. 88, 1323–1329.
- Xu S.H., Huang J.Z., Xu M.L., Yu G., Yin X.F., Chen D., Yan G.R. (2015). ACK1 promotes gastric cancer epithelial-mesenchymal transition and metastasis through AKT-POU2F1-ECD signalling. *J. Pathol.* 236, 175–185.
- Hwang-Verslues W.W., Chang P.H., Jeng Y.M., Kuo W.H., Chiang P.H., Chang Y.C., Hsieh T.H., Su F.Y., Lin L.C., Abbondante S., Yang C.Y., Hsu H.M., Yu J.C., Chang K.J., Shew J.Y., Lee E.Y., Lee W.H. (2013) Loss of corepressor PER2 under hypoxia upregulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 110, 12331–12336.
- 21. Qian J., Kong X., Deng N., Tan P., Chen H., Wang J., Li Z., Hu Y., Zou W., Xu J., Fang J.Y. (2015) OCT1 is a determinant of synbindin-related ERK signalling with independent prognostic significance in gastric cancer. *Gut.* **64**, 37–48.
- Kalamohan K., Periasamy J., Bhaskar R.D., Barnabas G.D., Ponnaiyan S., Ganesan K. (2014) Transcriptional coexpression network reveals the involvement of varying stem cell features with different dysregulations in different gastric cancer subtypes. *Mol. Oncol.* 8, 1306–1325.

POU2F1(Oct-1) DIFFERENTLY PARTICIPATES IN AUTOREGULATION OF ALTERNATIVE PROMOTORS DEPENDING ON BINDING WITH DIFFERENT REGULATORY SITES OF *POU2F1* GENE

E. V. Pankratova^{1, *}, T. N. Portseva¹, A. A. Makarova¹, B. M. Lyanova¹, S. G. Georgieva¹, and A. G. Stepchenko¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: pank@eimb.ru

The *POU2F1* gene, which plays an important role in the regulation of the genome and development of mammals, has both ubiquitous and tissue-specific promoters and has complex regulation. In this work, regions of the *POU2F1* gene were found containing multiple binding sites for the POU2F1(Oct-1) protein. The interspecies homology in these regions in human, mouse, rat, pig and dog genomes is more than 90%, and the complete identity of all the Oct-1 binding sites has been found. Some of these sites are located near each of the two alternative gene promoters, while others are in the 5' non-coding region of the gene at a distance of 6 kb upstream U promoter. With use of chromatin immunoprecipitation and EMSA it was shown that Oct-1 is present at these sites. Knockdown of *POU2F1* in Namalwa cells leads to activation of the ubiquitous U promoter and downregulation of the tissue-specific L promoter, while overexpression of Oct-1 leads to the opposite result. Thus, autoregulation of the ubiquitous promoter of the *POU2F1* gene occurs according to the principle of negative feedback, while the tissue-specific promoter according to the principle of positive feedback. In a natural context, negative feedback acts on the ubiquitous U promoter through low-affinity Oct-1 binding sites with an increase Oct-1 concentration in the cell, and at the same time, a positive feedback acts on the tissue-specific L promoter through the high-affinity canonical *oct*-sites.

Keywords: transcriptional autoregulation, POU2F1, transcription factor, Oct-1

— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ —

УДК 577.21

БЕЛКОВЫЙ ТРАНС-СПЛАЙСИНГ РЕКОМБИНАНТНОГО СТРЕПТАВИДИНА НА МАГНЕТОСОМАХ, ОПОСРЕДОВАННЫЙ ИНТЕИНОМ¹

© 2021 r. S. B. Duan^{*a*, *b*, ²}, S. S. Wei^{*a*, *b*, ²}, H. M. Wang^{*a*, *b*}, S. H. Ding^{*a*, *b*}, Y. Z. Chen^{*a*, *b*}, J. J. Tian^{*a*, *b*}, Y. J. Wang^{*a*}, W. Chen^{*c*}, J. Chen^{*c*}, *, Q. L. Meng^{*a*}, **

^aSuzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Suzhou, 215163 China ^bJihua Laboratory, Foshan, 315200 China ^cSuzhou Blood Center, Suzhou, 215006 China *e-mail: 108065767@qq.com **e-mail: 69161018@qq.com Поступила в редакцию 18.11.2020 г. После доработки 22.02.2021 г. Принята к публикации 12.03.2021 г.

Большую проблему при экспрессии рекомбинатного стрептавидина на магнетосомах (называемых бактериальными магнитными наночастицами, или ВМР) представляет присутствие эндогенного биотина. Мы соединили мономерный фрагмент стрептавидина (SA₁₋₁₁₆) с N-концом интеина и получили предшественник SA₁₋₁₁₆-IN, который экспрессировали в клетках *Escherichia coli* (BL21). Параллельно фрагмент SA₁₁₇₋₁₆₀ сшивали с С-концом интеина, после чего полученный химерный полипептид экспрессировали на магнетосомах за счет соединения с мембранным белком магнето-сом MamF. Далее в системе *in vitro* белкового сплайсинга смешивали очищенные сконструированные магнетосомы (BMP-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC) и предшественник SA₁₋₁₁₆-IN. Наконец, для получения функциональных магнитных частиц BMP-SA индуцировали опосредованный интеином транссплайсинг. Наши результаты указывают на возможность использования транс-сплайсинга, опосредованного интеином, для эффективного получения рекомбинантного стрептавидина на магнетосомах, а также показывают возможности этого метода для получения других функциональных магнитных наночастиц.

Ключевые слова: магнетосомы, функциональные магнитные наночастицы, стрептавидин, белковый сплайсинг, интеин

DOI: 10.31857/S0026898421060057

введение

Магнетосомы (называемые также бактериальными магнитными наночастицами, или ВМР) это окруженные мембраной однодоменные магнитные нанокристаллы, синтезируемые магнитотактическими бактериями. ВМР обладают высокой чувствительностью к магнитному полю, имеют небольшие размеры и видоспецифичную морфологию кристаллов [1, 2]. В состав мембраны ВМР входят специальные трансмембранные белки. Показано, что на мембранах ВМР наиболее представлены два белка — MamC и MamF [3]. Таким образом, генетическая инженерия MamC или MamF может использоваться для экспрессии чужеродных функциональных белков на поверхности ВМР [4]. Сделаны попытки получить различные функционализированные ВМР, например, за счет дисплея на ВМР функциональных компонентов, таких как ферменты, антитела, функциональные пептиды, рецепторные белки, частицы золота или олигонуклеотиды [5-8]. Значительное внимание в последнее время уделяется технологиям магнитной сепарации и иммуномагнитного анализа с использованием ВМР [9, 10]. ВМР сходны с коммерческими микро- и нано-иммуномагнитными частицами с двухфазной (ядрооболочка) структурой, однако обладают, как правило, большим магнетизмом, поскольку их ядра состоят из однодоменных магнитных кристаллов и содержат больше магнетита. Над ВМР легко производить манипуляции, так как они обладают сильным магнетизмом и небольшими размерами [11-13].

Стрептавидин (SA) — гомотетрамерный белок из *Streptomyces avidinii*, проявляет крайне высокую

¹ Статья представлена на английском языке.

² Эти авторы внесли равный вклад.

специфичность к молекулам биотина. За счет сильного, стабильного, нековалентного связывания стрептавидина и биотина иммунохимические методы анализа с использованием этой системы характеризуются наибольшей чувствительностью и позволяют обнаружить даже незначительные количества анализируемого вещества в биологических образцах [14]. Например, магнитные частицы, связанные со стрептавидином, часто используют в качестве твердой фазы в иммунохимии и в производстве диагностических препаратов [15]. Ранее мы получили рекомбинантный штамм магнитотактических бактерий для продукции ВМР, связанных с мономерным стрептавидином. Однако присутствие эндогенного биотина в магнитотактических бактериях может приводить к образованию комплексов стрептавидин-биотин, что затрудняет получение чистых функциональных BMP-SA.

Белковый сплайсинг – это посттрансляционное ремоделирование белков, катализируемое интеином. Разделенный интеин обладает способностью вырезать свои части из белков-прелшественников и сшивать фланкирующие полипептиды (экстеины) для получения зрелого белка и стабильного интеина. В настоящем исследовании для сшивания фрагментов SA1-116 и SA117-160 использовали разделенный интеин, состоящий из N-концевого фрагмента (IN) и С-концевого фрагмента (IC). SA₁₁₇₋₁₆₀-IC далее экспрессировали на ВМР за счет объелинения с белком MamF в рекомбинантном штамме магнитотактических бактерий. Наконец, очищенные предшественники BMP-SA117-160-IC и SA1-116-IN используют в in vitro белковом транссплайсинге, опосредованном интеином, для получения функциональных BMP-SA.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы и плазмиды. Штаммы бактерий, мутанты, плазмиды и праймеры, использованные в работе, перечислены в табл. 1. Культуры *Escherichia coli* растили при 37°С в среде Luria–Bertani (LB). Культуры *Magnetospirillum gryphiswaldense* (MSR-1) растили при 30°С в среде LAY, как описано ранее [16].

Конструирование рекомбинантных плазмид. Кодирующая последовательность SA₁₋₁₁₆-IN получена путем сшивания последовательностей SA₁₋₁₁₆ и IN₁₋₁₀₄ из Ssp DnaX с последующим клонированием в вектор экспрессии pET28a-SA₁₋₁₁₆-IN. Конструкция SA₁₁₇₋₁₆₀-IC-MamF получена путем объединения последовательностей SA₁₁₇₋₁₆₀, IC₁₀₅₋₁₆₃ и гена *тат* с последующим клонированием в вектор pBBR для получения плазмиды pBBR-mamF-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC. Экспрессионную плазмиду pET28а-SA1-116-IN использовали для трансформации компетентных клеток E. coli BL21 с целью получения штамма BL21-SA₁₋₁₁₆-IN. Рекомбинантной плазмидой pBBR-mamF-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC трансформировали клетки E. coli S17-1, а затем переносили ее в штамм MSR-1/ΔF посредством конъюгации. Мутантные штаммы MSR-1/ΔF-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC отбирали согласно [16].

Экспрессия и очистка SA₁₋₁₁₆-IN. Колонию штамма BL21-SA₁₋₁₁₆-IN выращивали в жидкой среде LB в присутствии 25 мкг/мл канамицина при 37°С. При достижении оптической плотности (*OD*₆₀₀), равной 0.4-0.6, добавляли 1 мМ ИПТГ и культивировали клетки при 37°С в течение 3-6 ч для индукции синтеза рекомбинантного белка. Культуру центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин, затем помещали в лизирующий буфер (50 мМ Трис-HCl, 1 ммоль/л EDTA, 100 ммоль/л NaCl и 1 мг/мл лизоцима, pH 8.0) и обрабатывали ультразвуком. Далее после центрифугирования (12000 g, 30 мин, 4°С) раствор фильтровали через 0.45 мкм фильтр и наносили на колонку с Ni-NTA. Белок SA₁₋₁₁₆-IN элюировали 100 мМ имидазолом и анализировали элек-

Название	Описание	Источник	
Штаммы			
MSR-1/ Δ F	<i>M. gryphiswaldense</i> MSR-1 с удаленным <i>mamF</i>	[10]	
MSR-1/ Δ F-SA ₁₁₇₋₁₆₀ -IC	MSR-1 с удаленным <i>mamF</i> , содержащий pBBR- <i>mamF</i> -SA117-160-	Данная работа	
	IC; Km ^r , Gm ^r		
<i>E. coli</i> S17-1	Pro thi hsdR recA, хромосомная интеграция RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7,	[10]	
	Sm ^r Tra ⁺		
BL21-SA ₁₋₁₁₆ -IN	<i>E. coli</i> BL21, содержащий рЕТ28а-SA1-116-IN	Данная работа	
pET28a-SA ₁₋₁₁₆ -IN	pET28a вектор с фрагментом SA1-116-IN; Km ^r	Данная работа	
pBBR-mamF-SA ₁₁₇₋₁₆₀ -IC	рВВR1MCS-2 вектор с фрагментом mamF-SA117-160-IC; Km ^r	Данная работа	

Таблица 1. Штаммы и плазмиды

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021



Рис. 1. *а* – Схематичное изображение белкового транс-сплайсинга, опосредованного интеином. δ – Анализ с помощью SDS-PAGE белков SA₁₋₁₁₆-IN (*1*), MamF-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC (*2*) и сплайсированных белков (*3*, MamF-SA соответствует размеру 31.5 кДа). *в* – Анализ взаимодействия между BMP-SA и биотинилированной ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. На первой дорожке в качестве контроля к смеси биотинилированной (600 п.н.) и небиотинилированной (1200 п.н.) ДНК не добавляли BMP-SA. На дорожках 2–5 титровали концентрацию BMP-SA в смеси ДНК и обнаруживали связывание с биотинилированной ДНК (600 п.н.).

трофорезом в 12%-ном полиакриламидном геле (SDS-PAGE).

Экспрессия и очистка BMP-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC. Клетки штамма MSR- $1/\Delta$ F-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC пересевали 3 раза, а затем нарабатывали в ферментере объемом 10 л. Условия культивирования и среду подбирали ра-

нее [17, 18]. Клетки MSR-1/ Δ F-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC собирали, помещали в PBS (10 мМ, pH 7.4; 20 мл/г осадка бактерий) и обрабатывали ультразвуком. Частицы BMP-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC выделяли с помощью магнитного штатива, ресуспендировали в PBS и снова озвучивали в течение нескольких подходов.

Очищенные BMP-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC помещали в стерильный 25%-ный раствор глицерина и хранили при 4°C.

Белковый транс-сплайсинг, опосредованный интеином. Для проведения *in vitro* транс-сплайсинга 20 мкМ SA₁₋₁₁₆-IN смешивали с 0.5 мг BMP-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC в буфере для сплайсинга (20 мМ Трис-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.9). Далее добавляли DTT в концентрации 1 мМ и инкубировали при комнатной температуре в течение ночи на шейкере. Реакцию останавливали, выделяя BMP с помощью магнита. Продукты сплайсинга анализировали с помощью SDS-PAGE и визуализировали, окрашивая Соотаssie Brilliant Blue R-250. Активность BMP-SA проверяли по взаимодействию с биотинилированной ДНК с последующим электрофорезом в агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Продукт гена Ssp DnaX – это интеин, обнаруженный в предшественнике ДНК-хеликазы Synechocystis sp. штамм PCC6803 [19, 20]. Мини-интеин получен путем сшивания N- и C-концевых последовательностей интеина Ssp DnaX. На рис. 1a показано, что интеин фланкирован предшественником SA₁₋₁₁₆ в качестве N-экстеина и SA₁₁₇₋₁₆₀ в качестве С-экстеина. В данном исследовании последовательность SA₁₋₁₁₆-IN получена путем сшивания SA₁₋₁₁₆ и IN₁₋₁₀₄ из Ssp DnaX. Клетки *E. coli* BL21 трансформировали плазмидой pET28a-SA₁₋₁₁₆-IN для получения белка SA₁₋₁₁₆-IN после индукции синтеза с помощью ИПТГ. Очищенный белок анализировали с помощью электрофореза (рис. 1б). Конструкция SA₁₁₇₋₁₆₀-IC-MamF получена путем объединения последовательностей SA₁₁₇₋₁₆₀ IC₁₀₅₋₁₆₃ из Ssp DnaX и гена mamF. Далее SA₁₁₇₋₁₆₀-IC-mamF клонировали в вектор pBBR для получения pBBR-mamF-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC. Этой плазмидой трансфицировали MSR-1/ Δ F с помощью конъюгации, а затем отбирали клоны MSR-1/ ΔF-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC. Частицы BMP-SA117-160-IC выделяли и очищали из культуры клеток MSR-1/ΔF-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC. Мембранный белок MamF-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC анализировали с помощью электрофореза (рис. 1б). Очищенные SA₁₋₁₁₆-IN и BMP-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC смешивали в буфере для сплайсинга и индуцировали перенос экстеина SA₁₋₁₁₆ (N-экстеин) на N-конец SA₁₁₇₋₁₆₀ (С-экстеин), получая таким образом BMP-SA. Продукты сплайсинга, включая белок MamF-SA, анализировали с помошью электрофореза. Эффективность реакции составляла примерно 20% (рис. 1б). Активность ВМР-SA оценивали, добавляя разное количество этих частиц к биотинилированной ДНК (1 мкг). По данным электрофореза в агарозном геле (рис. 1в) 10 мкг частиц ВМР-SA связывали как минимум 1 мкг биотинилированной ДНК (600 п.н.). Не обнаружили связывания небиотинилированной ДНК (1 мкг, 1200 п.н.), использованной в качестве контроля, с частицами ВМР-SA (рис. 1*в*).

Уникальной особенностью ВМР является возможность экспрессировать на их поверхности функциональные белки с помощью генетической инженерии. В ряде исследований получены частицы с функциональными белками, такими как белок А, наноантитела, ферменты. Благодаря большому количеству активных молекул на поверхности функционализированных ВМР, комплексы ВМР-белок удобны для магнитной сепарации и иммуномагнитного анализа. При этом сложность экспрессии белков в магнитотактических бактериях делает невозможной экспрессию некоторых активных факторов на поверхности ВМР. Так, присутствие эндогенного биотина в магнитотактических бактериях может повлиять на активность BMP-SA за счет блокирования активных сайтов стрептавидина. Таким образом, нами описана новая стратегия встраивания определенных пептидов в мембранный белок ВМР с помощью белкового сплайсинга, опосредованного интеином. ВМР представляют собой биогенные магнитные экологичные наноматериалы. Интеиновый транс-сплайсинг используется для сплайсинга и лигирования белков в различных областях, включая сшивку, мечение, очистку и перевод в растворимую форму. Нами показано, что предложенный подход удобен для получения функционализированных частиц ВМР.

Работа поддержана Фондом естественных наук провинции Цзянсу (грант № ВК20180224), Программой науки и образования Департамента Здравоохранения Сучжоу (КЈХW2017056), Исследовательским фондом лаборатории Джихуа (грант № Х190171TD190) и Проектом развития научного оборудования Китайской академии наук (грант № УЈКҮҮQ20200037).

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. Uebe R., Schuler D. (2016) Magnetosome biogenesis in magnetotactic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 621–637.
- Bazylinski D.A., Frankel R.B. (2004) Magnetosome formation in prokaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 217–230.
- Grunberg K., Muller E.C., Otto A., Reszka R., Linder D., Kube M., Reinhardt R., Schuler D. (2004) Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in Magnetospirillum gryphiswaldense. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1040–1050.
- Greene S.E., Komeili A. (2012) Biogenesis and subcellular organization of the magnetosome organelles of magnetotactic bacteria. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 490– 495.

- Yan L., Da H., Zhang S., Lopez V.M., Wang W. (2017) Bacterial magnetosome and its potential application. *Microbiol Res.* 203, 19–28.
- Xu J., Liu L., He J., Ma S., Li S., Wang Z., Xu T., Jiang W., Wen Y., Li Y., Tian J., Li F. (2019) Engineered magnetosomes fused to functional molecule (protein A) provide a highly effective alternative to commercial immunomagnetic beads. J. Nanobiotechnology. 17, 37.
- Pollithy A., Romer T., Lang C., Muller F.D., Helma J., Leonhardt H., Rothbauer U., Schuler D. (2011) Magnetosome expression of functional camelid antibody fragments (nanobodies) in Magnetospirillum gryphiswaldense. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6165–6171.
- 8. Wu W., Wu Z., Yu T., Jiang C., Kim W.S. (2015) Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 023501.
- Li A., Zhang H., Zhang X., Wang Q., Tian J., Li Y., Li J. (2010) Rapid separation and immunoassay for low levels of *Salmonella* in foods using magnetosome-antibody complex and real-time fluorescence quantitative PCR. *J. Sep. Sci.* 33, 3437–3443.
- Xu J., Hu J., Liu L., Li L., Wang X., Zhang H., Jiang W., Tian J., Li Y., Li J. (2014) Surface expression of protein A on magnetosomes and capture of pathogenic bacteria by magnetosome/antibody complexes. *Front. Microbiol.* 5, 136.
- Ali I., Peng C., Khan Z.M., Naz I. (2017) Yield cultivation of magnetotactic bacteria and magnetosomes: a review. J. Basic Microbiol. 57, 643–652.
- Tanaka T., Matsunaga T. (2000) Fully automated chemiluminescence immunoassay of insulin using antibody-protein A-bacterial magnetic particle complexes. *Anal. Chem.* 72, 3518–3522.

- Jacob J.J., Suthindhiran K. (2016) Magnetotactic bacteria and magnetosomes – Scope and challenges. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 68, 919–928.
- Lim K.H., Huang H., Pralle A., Park S. (2013) Stable, high-affinity streptavidin monomer for protein labeling and monovalent biotin detection. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 57–67.
- Dundas C.M., Demonte D., Park S. (2013) Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9343–9353.
- Liu J., Ding Y., Jiang W., Tian J., Li Y., Li J. (2008) A mutation upstream of an ATPase gene significantly increases magnetosome production in *Magnetospirillum* gryphiswaldense. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81, 551– 558.
- Zhang Y., Zhang X., Jiang W., Li Y., Li J. (2011) Semicontinuous culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 cells in an autofermentor by nutrient-balanced and isosmotic feeding strategies. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5851–5856.
- Yang C., Takeyama H., Matsunaga T. (2001) Iron feeding optimization and plasmid stability in production of recombinant bacterial magnetic particles by *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 in fed-batch culture. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 213–216.
- Liu X.Q., Hu Z. (1997) Identification and characterization of a cyanobacterial DnaX intein. *FEBS Lett.* 408, 311–314.
- Zhang X., Liu X.Q., Meng Q. (2019) Engineered *Ssp* DnaX inteins for protein splicing with flanking proline residues. *Saudi J. Biol. Sci.* 26, 854–859.

INTEIN-MEDIATED PROTEIN TRANS-SPLICING OF THE RECOMBINANT STREPTAVIDIN ON MAGNETOSOMES

S. B. Duan^{1, 2}, S. S. Wei^{1, 2}, H. M. Wang^{1, 2}, S. H. Ding^{1, 2}, Y. Z. Chen^{1, 2}, J. J. Tian^{1, 2}, Y. J. Wang¹, W. Chen³, J. Chen^{3, *}, and Q. L. Meng^{1, **}

¹ Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Suzhou, 215163 China

² Jihua Laboratory, Foshan, 315200 China

³ Suzhou Blood Center, Suzhou, 215006 China

*e-mail: 108065767@qq.com

**e-mail: 69161018@qq.com

When expressing streptavidin recombinant polypeptide on magnetosomes (called bacterial magnetic nanoparticles, or BMPs), the presence of endogenous bacterial biotin might be detrimental. In the study, the streptavidin monomer fragment (SA₁₋₁₁₆) was fused with the intein N-terminal (termed precursor SA₁₋₁₁₆-IN), and SA₁₋₁₁₆-IN was expressed in *E. coli* (BL21). Meanwhile, the SA₁₁₇₋₁₆₀ fragment was fused with the C-terminal intein, and then this chimeric polypeptide was expressed on magnetosomes by fusion with magnetosome membrance protein MamF. In the *in vitro* protein splicing system, the purified engineered magnetosomes (BMP-SA₁₁₇₋₁₆₀-IC) and the SA₁₋₁₁₆-IN precursor were mixed. Intein-mediated trans-splicing reaction was induced to produce the functional magnetic beads BMP-SA. Our results indicate that intein-mediated protein trans-splicing may lead to efficient synthesis of the recombinant streptavidin on the magnetosomes, showing its promising potential to produce other functional magnetic nanoparticles.

Keywords: magnetosomes, functional magnetic nanoparticles, streptavidin, intein-mediated protein splicing

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 615.371

ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ДНК-КОНСТРУКЦИИ, КОДИРУЮЩЕЙ РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН БЕЛКА ШИПА SARS-CoV-2

© 2021 г. М. Б. Боргоякова^{*a*, *}, Л. И. Карпенко^{*a*}, А. П. Рудомётов^{*a*}, Д. В. Шаньшин^{*a*}, А. А. Исаева^{*a*, *b*}, В. С. Несмеянова^{*a*, *b*}, Н. В. Волкова^{*a*}, С. В. Беленькая^{*a*}, Д. Е. Мурашкин^{*a*}, Д. Н. Щербаков^{*a*, *b*}, Е. А. Волосникова^{*a*}, Е. В. Старостина^{*a*}, Л. А. Орлова^{*a*}, Н. В. Данильченко^{*a*}, А. В. Зайковская^{*a*}, О. В. Пьянков^{*a*}, А. А. Ильичёв^{*a*}

^а Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская область, 630559 Россия

^bГосударственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий. Кольиово.

Новосибирская область, 630559 Россия

*e-mail: borgoyakova_mb@vector.nsc.ru Поступила в редакцию 07.03.2021 г. После доработки 19.04.2021 г. Принята к публикации 20.04.2021 г.

В связи с пандемией COVID-19 – заболевания, вызванного новым коронавирусом SARS-CoV-2, – чрезвычайно актуальна задача скорейшей разработки профилактической вакцины. Нами сконструирована плазмида pVAX-RBD, которая несет последовательность, кодирующую рецепторсвязывающий домен (RBD) белка шипа (S) SARS-CoV-2 в качестве иммуногена и уникальную сигнальную последовательность 176, способствующую секреции целевого белка во внеклеточное пространство, для повышения эффективности индукции гуморального иммунного ответа на вирусный антиген. Для доставки pVAX-RBD в клетки использован конъюгат полиглюкина со спермидином (PGS). При сравнении иммуногенности "голой" ДНК, pVAX-RBD, и pVAX-RBD в оболочке PGS (pVAX-RBD–PGS) показано, что последняя эффективнее индуцирует иммунный ответ у мышей. Так, по результатам иммуноферментного анализа, у животных в группе pVAX-RBD титр RBD-специфичных антител не превышал 1 : 1000, а в группе pVAX-RBD-PGS составил 1 : 42000. ДНК-конструкт pVAX-RBD-PGS эффективно индуцировал и клеточный иммунный ответ. Методом ELISpot показано, что спленоциты иммунизированных животных эффективно продуцируют интерферон-у в ответ на стимуляцию пулом пептидов из белка S. На основании полученных результатов композицию pVAX-RBD в оболочке конъюгата полиглюкина со спермидином можно рассматривать в качестве перспективной ДНК-вакцины против COVID-19.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, ДНК-вакцина, иммунный ответ, мышиная модель DOI: 10.31857/S0026898421060045

Для создания вакцины против коронавируса-2, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2), задействованы все известные на данный момент платформы: инактивированный вирус [1, 2], рекомбинантные белки и синтетические пептиды [3–5], векторные вакцины [6, 7], конструкции на основе ДНК [8, 9] и мРНК [10, 11]. Все эти подходы имеют свои преимущества и недостатки. ДНК-вакцины отличает быстрота и простота разработки, низкая стоимость производства, безопасность в использовании, способность индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет. Несмотря на то, что первые поколения ДНК-вакцин не отличались высокой иммунологической эффективностью, дальнейшее развитие этой платформы продолжалось и было направлено на поиски средств доставки и адъювантов, способных усилить эффект ДНК-вакцинации. По данным ВОЗ, на июнь 2021 года 10 ДНК-вакцин против SARS-CoV-2 находится на стадии клинических и еще 16 — на стадии доклинических испытаний (https://www.who.int/publications/m/item/draftlandscape-of-covid-19-candidate-vaccines).

Сокращения: COVID-19 (coronavirus infectious disease) — коронавирусное инфекционное заболевание; PGS (polyglucin-spermidine conjugate) — конъюгат полиглюкин-спермидин; RBD (receptor-binding domain) — рецепторсвязывающий домен белка шипа; SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2) — коронавирус-2 острого респираторного синдрома.

К основным мишеням конструируемых вакцин против SARS-CoV-2 относятся белок шипа (S) и его рецепторсвязывающий домен (RBD), который связывается с ангиотензинконвертирующим ферментом-2 (ACE2) на поверхности клеткимишени, тем самым инициируя проникновение вируса в клетку [12]. Несколько групп, уже имеющих в своем арсенале рабочие векторные плазмиды, смогли быстро создать вакцинные прототипы и исследовать их иммуногенность на животных, буквально спустя несколько недель после появления последовательности гена S-белка SARS-CoV-2 в открытом доступе [8].

Нами сконструирована кандидатная вакцинная ДНК, кодирующая RBD белка S SARS-CoV-2 (pVAX-RBD). Для повышения синтеза белка-иммуногена, кодируемого этой плазмидой, мы оптимизировали состав кодонов целевого гена. Для эффективного транспорта белка из клетки в состав pVAX-RBD входит последовательность, кодирующая оригинальную лидерную последовательность 176 — гибрид сигнальных последовательностей двух активно секретируемых белков: люциферазы и фиброина. Для упаковки и доставки ДНК-вакцины использован поликатионный конъюгат полиглюкина со спермидином (далее PGS), который ранее опробован нами при разработке вакцин против ВИЧ-1 [13, 14], вируса Эбола [15] и мРНК-вакцины против SARS-CoV-2 [16]. Теперь мы представляем результаты исследования иммуногенности плазмилы pVAX-RBD в оболочке PGS как потенциальной ДНК-вакцины против SARS-CoV-2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструирование иммуногенов. Для конструирования иммуногенов использовали последовательность гена, кодирующего полноразмерный белок S SARS-CoV-2 (GenBank Acc. No. MN908947). Для оптимизации состава кодонов, а также вторичной структуры PHK для эффективной экспрессии в клетках млекопитающих использовали программу GeneOptimizer (https://www.thermofisher.com/ ru/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html). Полученную нуклеотидную последовательность синтезировали в ООО "ДНК-синтез" (Россия) и клонировали в составе вектора pGH.

Для амплификации фрагмента, кодирующего RBD белка S (³²⁰V–⁵⁴²N) и сигнальную последовательность 176 (MMRTLILAVLLVYFCATVHC) на 5'-конце, использовали праймеры: 5'-TA-ATACGACTCACTATAGGCTAGCCT-3' (прямой) и 5'-AAAAAAGCGGCCGCTCATTAGTT-GAAGTTCACGCATTTGTTCTTC-3' (обратный), – и матрицу, содержащую указанный фрагмент (любезно предоставлена лабораторией иммунохимии ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора). Продукт амплификации встраивали в вектор pVAX ("Thermo Fisher Scientific", США) по сайтам NheI и NotI. Структуру полученной конструкции подтверждали секвенированием по методу Сэнгера в ЦКП "Геномика" (Россия). Полученную конструкцию обозначили pVAX-RBD.

Наработка плазмидной ДНК для иммунизации. Клетки *Escherichia coli* Stbl3 трансформировали плазмидами pVAX и pVAX-RBD с помощью хлористого кальция. Наработку плазмидной ДНК для иммунизации проводили в 2.7 л питательной среды LB с добавлением канамицина (25 мкг/мл). Плазмидную ДНК выделяли и очищали с помощью набора EndoFree Plasmid Giga Kit ("QIAGEN", Германия) согласно рекомендациям производителя. Количество эндотоксинов определяли LAL-тестом по инструкции производителя, образование геля определяли визуально ("Charles River", США).

Трансфекция клеток НЕК-293Т и СНО-К1 **ДНК-конструкциями.** Клеточные культуры НЕК-293Т и СНО-К1 были получены из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора. Трансфекцию клеток НЕК-293Т и CHO-K1 проводили с помощью Lipofectamine 3000 ("Invitrogen", США) согласно инструкции производителя. Клетки высевали на 24-луночные планшеты в количестве 10⁷ клеток на лунку и культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS). В день трансфекции среду заменяли на поддерживающую, содержащую 2% FBS. В лунки планшета вносили по 2 мкг плазмидной ДНК с Lipofectamine 3000 и помещали планшет в инкубатор с 5% СО₂. Через 48 ч после трансфекции клетки вместе с культуральной средой переносили в пробирки и центрифугировали 5 мин при $800 \times g$, после чего в осадке и супернатанте оценивали экспрессию гена, кодирующего RBD, используя ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и иммуноблотинг.

Оценка экспрессии целевого белка методом иммуноблотинга. Осадок клеток СНО-К1 ресуспендировали в PBS и лизировали с помощью ультразвука на гомогенизаторе Soniprep 150 Plus ("MSE", Великобритания). Для разделения белков в лунки 12%-ного полиакриламидного геля вносили 10 мкл лизата клеток СНО-К1, трансфицированных плазмидами pVAX-RBD или pVAX, или 10 мкл супернатанта (среда после культивирования клеток), после чего проводили электрофорез с последуюшим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану, которую затем блокировали BSA, отмывали и инкубировали с гипериммунной мышиной сывороткой, разведенной в 5000 раз (сыворотка была получена из крови мышей, иммунизированных инактивированным вирусом SAR-CoV-2 (неопубликованные данные). В качестве вторичных антител использовали конъюгированные со ще-
лочной фосфатазой антитела кролика против IgG мыши ("Sigma", США), а в качестве субстратов – BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) и NBT (nitro blue tetrazolium) ("Thermo Fisher Scien-tific").

ОТ-ПЦР. Уровень экспрессии мРНК RBD оценивали методом ОТ-ПЦР. Тотальную РНК выделяли из клеток, трансфицированных pVAX-RBD или pVAX, с использованием набора для выделения РНК (ООО "Биолабмикс", Россия) и транскрибировали получившуюся РНК в кДНК с последующим проведением ПЦР с помощью набора для ОТ-ПЦР (ООО "Биолабмикс") со специфическими праймерами к гену, кодирующему RBD: 5'-TAATACGACTCACTATAGGCTAGCCT-3' (прямой) и 5'-ААААААGCGGCCGCTCATTAGTT-**GAAGTTCACGCATTTGTTCTTC-3**' (обратный). ОТ-ПЦР проводили в следующих условиях: обратная транскрипция 30 мин при 45°С, начальная денатурация 5 мин при 95°С, 30 циклов последовательных денатурации (15 с при 95°С), отжига праймеров (20 с при 58°С) и элонгации (1 мин при 72° C) и терминальная элонгация 5 мин при 72° C. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле.

Получение комплексов ДНК-PGS. На первом этапе получали активированный декстран путем его окисления по гликолям. Для этого 1 моль декстрана 40000 ("МРВіотеdicals™", США) обрабатывали 40 молями периодата натрия в течении 60 мин, после чего очищали окисленный продукт от избытка окислителя на колонке с сефадексом G-25 в 50 мМ карбонатном буфере (рН 8.6). Далее в раствор окисленного декстрана добавляли раствор спермидина ("Sigma") из расчета 15 молей на 1 моль декстрана, инкубировали в течение 2 ч и добавляли в смесь боргидрид натрия из расчета 80 молей на 1 моль декстрана. Смесь инкубировали еще 2 ч и очищали целевой продукт от непрореагировавших компонентов гель-фильтрацией на сефадексе G-25, уравновешенном PBS. Для формирования комплексов ДНК смешивали с PGS в массовом соотношении 1 : 10 [15, 16] и оценивали выход по изменению электрофоретической подвижности ДНК в 1%-ном агарозном геле.

Иммунизация мышей. Работу с животными проводили согласно "Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных". Эксперименты были одобрены на заседании биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, номер протокола ГНЦ ВБ "Вектор"/10-09.2020.

В исследовании использовали самок мышей BALB/с весом 16–18 г, которых случайным образом разделили на 4 группы по 6 животных. Каждая группа была проиммунизирована трижды с двухнедельным интервалом одним из следующих препаратов: pVAX-RBD–PGS (группа pVAX-RBD–PGS), pVAX-RBD (группа pVAX-RBD) и плазмидой pVAX–PGS (плазмида pVAX в оболочке PGS; группа pVAX–PGS). Для инъекций использовали раствор 100 мкг соответствующей ДНК в 200 мкл физиологического раствора, который вводили животным внутримышечно в задние лапы (по 100 мкл в каждую).

Иммуноферментный анализ сывороток. Уровень индуцированных вакцинными препаратами антител определяли в сыворотках крови животных через 6 недель после первой иммунизации. Сыворотки отделяли от клеточных элементов центрифугированием (9000 $\times g$, 15 мин) и полученный супернатант прогревали при 56°С в течение 30 мин для инактивации системы комплемента.

В качестве антигена для иммуноферментного анализа (ИФА) использовали белок RBD, полученный в эукариотических продуцентах (клетках СНО-К1) и очищенный с помощью методов аффинной и ионнообменной хроматографии (чистота белка составляла более 98%) (белок любезно предоставлен лабораторией иммунохимии ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора). Белок RBD (1 мкг/мл в 2 М мочевине) сорбировали на 96-луночные планшеты ("Greiner Bio-One", Германия) при 4°С в течение ночи, планшет промывали в PBS с 0.05% Tween 20 (PBST) и блокировали 1%-ным раствором казеина в том же буфере в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем в лунки добавляли сыворотки в трехкратном серийном разведении, начиная с 1:50, в блокирующем растворе и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Планшет промывали, добавляли конъюгированные с пероксидазой хрена кроличьи антитела против IgG мыши ("Sigma") и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. В лунки планшета, промытого PBST, вносили субстрат TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) ("Amresco", США). Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере ChroMate-4300 ("Awareness Technology Inc.", США). За титр в ИФА принимали разведение сыворотки, при котором значение оптической плотности более чем в два раза превышало таковую для отрицательного контроля (в лунки вместо сыворотки добавлен блокирующий буфер).

Оценка вируснейтрализующей активности сывороток. В работе использован штамм nCoV/Victoria/1/2020 SARS-CoV-2 (Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ БВ "Вектор" Роспотребнадзора). Пул вируса был наработан на культуре клеток Vero E6 (Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ БВ "Вектор" Роспотребнадзора) с титром 6.5 lgTЦД₅₀/мл (50%-ная тканевая цитопатическая доза). Рабочая доза вируса составила 100 ТЦД₅₀. Для оценки

эффективности нейтрализующей активности сывороток готовили их серийные двукратные разведения, начиная с разведения 1 : 10 до 1 : 2560. Для разведения сывороток использовали среду DMEM с L-глутамином и антибиотиками (100 ед/мл пенициллин. 100 мкг/мл стрептомицин). Образцы разведений сыворотки и вируса в рабочей дозе смешивали в равных объемах, инкубировали 1 ч при комнатной температуре, вносили в лунки 96луночного планшета с монослоем культуры клеток Vero E6 и инкубировали в течение 4 суток при 37°С в атмосфере 5% СО₂. Для окрашивания клеток в каждую лунку планшета добавляли 150 мкл 0.2%-ного раствора генцианвиолета (1 г генцианвиолета в 20 мл 96%-ного этанола, 120 мл 40%-ного формалина и 350 мл раствора Хенкса). Через 30 мин жидкость из лунок удаляли и промывали водой. Результаты регистрировали визуально. Любое специфическое повреждение клеточной культуры в лунке считалось цитопатическим эффектом вируса. Нейтрализующую активность сывороток иммунизированных животных оценивали по титру (разведению) сывороток, при котором регистрировали защиту клеток от цитопатического действия вируса в 50% лунок. Титр нейтрализую-

Таблица 1. Список пептидов S-белка SARS-CoV-2, использованных для стимуляции спленоцитов мышей BALB/c, при определении Т-клеточного ответа методом ELISpot

№ п/п	Пептиды	МНС-рестрикция
1	SGTNGTKRF	H-2-Dd
2	YYHKNNKSW	H-2-Kd
3	KYNENGTIT	H-2-Kd
4	VYAWNRKRI	H-2-Kd
5	FERDISTEI	H-2-Ld
6	CGPKKSTNL	
7	SYQTQTNSP	H-2-Kd
8	SKPSKRSFI	H-2-Dd
9	KYFKNHTSP	H-2-Kd
10	YPDKVFRSSVLHSTQ	H2-IEd
11	DPFLGVYYHKNNKSW	H2-IEd
12	KNIDGYFKIYSKHTP	H2-IEd
13	RFASVYAWNRKRISN	H2-IEd, H2-IAd
14	VGGNYNYLYRLFRKS	H2-IEd
15	GGNYNYLYRLFRKSN	H2-IEd
16	YNYKLPDDFTGCVIA	H2-IEd
17	NATRFASVYAWNRKR	H2-IEd, H2-IAd
18	SNGTHWFVTQRNFYE	H2-IEd
19	YEQYIKWPSGRLVPR	H2-IEd
20	KNKCVNFNFNGLTGT	H2-IEd

щих антител рассчитывали по формуле Рида-Менча [17].

Оценка Т-клеточного иммунного ответа. Величину Т-клеточного иммунного ответа определяли с помощью метода ELISpot с использованием набора Mouse IFN-gamma ELISpot kit ("BD". США). Селезенки животных извлекали через две недели после третьей иммунизации. Спленоциты получали последовательной гомогенизацией через фильтры 70 и 40 мкм ("BD Falcon", США). После лизиса эритроцитов лизирующим буфером ("Sigma") спленоциты дважды отмывали в среде RPMI и помещали в 1 мл среды RPMI с 2 мМ L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина. На 96-луночном планшете из набора были иммобилизованы антитела против интерферона-у (IFN-у) мыши. После блокировки планшета RPMI спленоциты пассировали в количестве 5 × 10⁵ клеток/лунка и стимулировали смесью пептилов в концентрации 20 мкг/мл для каждого пептида. Клетки инкубировали 20 ч при 37°С в атмосфере 5% СО₂, затем плашки отмывали, добавляли биотинилированные антитела против мышиного IFN-у, которые проявляли с помощью конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена и субстрата АЕС (3-amino-9-ethylcarbazole). Число IFN-ү-продуцирующих клеток подсчитывали с помощью ELISpotридера ("Carl Zeiss", Германия).

Для стимуляции спленоцитов, выделенных из иммунизированных животных, использовали пул из 20 пептидов из последовательности S-белка SARS-CoV-2, рестриктируемых молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I (H-2-Dd, H-2-Kd, H-2-Ld) и класса II (H2-IAd, H2-IEd) мышей BALB/с (табл. 1). Пептиды были синтезированы компанией "AtaGenix Laboratories" (Китай), чистота пептидов составляла более 80%.

Статистическая обработка. Сравнение полученных результатов выполнено с использованием непараметрического метода Манна—Уитни с помощью программного обеспечения GraphPad-Prism 6.0. При p < 0.05 различия между двумя группами считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн конструкции и проверка ее свойств in vitro

Последовательность, выбранная нами для работы, соответствует опубликованной в GenBank для гена S-белка SARS-CoV-2 (MN908947). Для повышения экспрессии и иммуногенности созданной ДНК-конструкции мы провели оптимизацию состава кодонов последовательности ДНК, кодирующей S-белок SARS-CoV-2, с использованием программы GeneOptimizer. Оптимизированную последовательность ДНК, кодирующую S-белок, синтезировали и клонировали в составе вектор-



Рис. 1. Генетическая карта плазмиды pVAX-RBD. Обозначения: ori — точка начала репликации; bGH poly(A) (bovine growth hormone polyadenylation) — терминальная последовательность, обеспечивающая экспрессию белка в эукариотических клетках; *NeoR/KanR* — ген устойчивости к неомицину и канамицину.

ной плазмиды pGh. Фрагмент, кодирующий RBD и сигнальную последовательность 176, клонировали в вектор pVAX по сайтам NheI и NotI (рис. 1) под немедленный ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV).

В результате получена ДНК-конструкция pVAX-RBD, кодирующая RBD с сигнальной последовательностью. Препарат экспериментальной ДНК-вакцины был наработан и очищен, содержание эндотоксинов в конечном препарате не превышало 4 единиц (ЕЭ) на одну дозу (100 мкг ДНК), что ниже пороговых значений, установленных для вакцинных препаратов [18].

Экспрессия последовательности, кодирующей RBD, в клетках HEK-293T

Экспрессию нуклеотидной последовательности, кодирующей RBD, в клетках HEK-293T оценивали с помощью ОТ-ПЦР. Для этого клетки трансфицировали плазмидами pVAX-RBD и pVAX, выделяли тотальную PHK, а затем получали кДНК с RBD-кодирующей последовательности с помощью специфических праймеров. На электрофореграмме (рис. 2) видно, что размер амплифицированного фрагмента, полученного из клеток, трансфицированных pVAX-RBD, соответствует размеру последовательности, кодирующей RBD (750 п.о.). По наличию мPHK RBD в трансфицированных клетках HEK-293T судили об эффективности трансфекции клеток плазмидами.

Экспрессия RBD в трансфицированных клетках CHO-K1

Экспрессию RBD в клетках CHO-K1 оценивали методом иммуноблотинга (рис. 3). На дорожках 2 и 5 видны белковые полосы, соответствующие по молекулярной массе RBD (~35 кДа) и связывающиеся с антителами мышей, иммунизированных SARS-CoV-2. Следовательно, в трансфициро-



Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов ОТ-ПЦР в 1%-ном агарозном геле. Дорожки 1 и 2 – продукты, полученные из суммарной РНК клеток НЕК-293Т, трансфицированных pVAX-RBD и pVAX соотсветственно; дорожка 3 – продукт, полученный с помощью ПЦР из плазмиды pVAX-RBD, кодирующей RBD, в качестве положительного контроля. М – маркер молекулярных масс ДНК М12 ("СибЭнзим", Россия).



Рис. 3. Анализ экспрессии RBD в клетках CHO-K1, трансфицированных pVAX-RBD и pVAX. Дорожка *1* – маркер молекулярных масс белков; *2* и *3* – лизат клеток CHO-K1, трансфицированных pVAX-RBD и pVAX соответственно; *4* и *5* – культуральная среда клеток CHO-K1, трансфицированных pVAX и pVAX-RBD соответственно.

ванных клетках присутствует целевой белок (дорожка 2), который секретируется клетками в культуральную среду (дорожка 5). Заметим, что в лизате полоса с подвижностью несколько выше 25 кДа (дорожка 2) может быть связана с тем, что продукт не полностью/совсем не гликозилирован (масса белка без гликозилирования – 27 кДа). В лизате и культуральной среде клеток СНО-К1, трансфицированных контрольной плазмидой pVAX, не обнаружено белков, специфически реагирующих с антителами мышей, иммунизированных SARS-CoV-2 (дорожки 3 и 4).

Таким образом, после трансфекции клеточной линии CHO-K1 конструкцией pVAX-RBD ген, кодирующий RBD, экспрессируется как на уровне PHK, так и на уровне белка.

Получение комплексов ДНК с PGS

Оптимальное соотношение масс компонентов для формирования комплексов ДНК-полимер подбирали на основании результатов анализа степени комплексообразования, полученных нами ранее [15]. Соотношение масс ДНК : PGS для образования комплексов составило 1 : 10. Взаимодействие ДНК с конъюгатом PGS оценивали по смещению электрофоретической подвижности в агарозном геле (рис. 4). Это же соотношение использовано для создания комплекса контрольной плазмиды pVAX с конъюгатом PGS.



Рис. 4. Анализ формирования комплекса pVAX-RBD с PGS. Представлены результаты электрофореза в 1%-ном агарозном геле, соотношение ДНК : PGS – 1 : 10. Дорожка *1* – плазмида pVAX-RBD, *2* – комплекс плазмиды pVAX-RBD с PGS, М – маркер М12 длин ДНК ("СибЭнзим").

pVAX-RBD индуцирует гуморальный иммунный ответ у мышей

Для оценки иммуногенности вакцинных конструкций pVAX-RBD—PGS и pVAX-RBD мышей иммунизировали трижды в дни 0, 14, 28 и через шесть недель после начала эксперимента у животных брали кровь для анализа (рис. 5*a*). Полученные сыворотки крови исследовали на наличие RBD-специфичных антител методом ИФА и в реакции нейтрализации SARS-CoV-2. В качестве контроля использовали сыворотку мышей, иммунизированных комплексом pVAX—PGS.

По результатам ИФА через две недели после третьей иммунизации средние титры специфических антител у животных, иммунизированных pVAX-RBD–PGS, были примерно в 40 раз выше по сравнению с животными, иммунизированными pVAX-RBD (p < 0.01), и в 10000 раз выше, чем титры в контрольной группе, которой вводили pVAX–PGS (p < 0.01) (рис. 56).

Вируснейтрализующую активность полученных сывороток оценивали в реакции нейтрализации *in vitro* с живым вирусом SARS-CoV-2. Сыворотки мышей, иммунизированных pVAX-RBD—PGS, нейтрализовали штамм nCoV/Victoria/1/2020 SARS-CoV-2 в разведении 1 : 200, тогда как сыворотки группы, иммунизированной pVAX-RBD, — в разведении 1 : 12 (p < 0.01). Сыворотки контрольных животных не проявили нейтрализующей активности (рис. 5*в*).



Рис. 5. Гуморальный иммунный ответ у мышей на ДНК-конструкции pVAX-RBD–PGS, pVAX-RBD и pVAX–PGS. a – Схема иммунизации и забора образцов: вакцинные конструкции вводили мышам трижды с двухнедельным интервалом. Через шесть недель после первой иммунизации у мышей брали кровь и селезенку для анализа. δ – Титры RBD-специфичных антител IgG определяли метом ИФА. На графике представлены обратные значения титров (разведения). e – Вируснейтрализующую активность сывороток определяли в реакции нейтрализации SARS-CoV-2 (штамм nCoV/Victoria/1/2020). На графике представлены обратные значения титров. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD). Достоверность рассчитывали с использованием непараметрического метода Манна–Уитни (n.s. – нет статистической достоверности, *p < 0.01, **p < 0.05).

pVAX-RBD индуцирует клеточный иммунный ответ

Т-клеточный иммунный ответ оценивали по числу спленоцитов, продуцирующих IFN-γ, используя технологию ELISpot. Спленоциты стимулировали пулом пептидов, входящих в состав белка S.

Показано, что спленоциты, выделенные из селезенок мышей через две недели после третьей иммунизации pVAX-RBD в оболочке PGS и без нее, сильнее отвечали на стимуляцию вирусными пептидами выбросом IFN- γ , чем контрольная группа (p < 0.01) (рис. 6). Из этого можно сделать вывод о развитии у иммунизированных животных RBD-специфичного T-клеточного ответа. В группе животных, иммунизированной pVAX-

RBD–PGS, содержание Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN-γ, было несколько выше, чем в группе, иммунизированной "голой" ДНК – pVAX-RBD, – однако эти различия не были статистически достоверными.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ДНК-вакцины — одна из платформ, на основе которой были разработаны и уже дошли до III фазы клинических испытаний кандидатные вакцины против COVID-19. Такие вакцины можно быстро создать, зная нуклеотидную последовательность вирусного генома. Среди преимуществ ДНК-вакцин можно перечислить следующие: антиген экспрессируется в нативной конформации,



Рис. 6. Сравнение Т-клеточного ответа у мышей, иммунизированных pVAX-RBD–PGS, pVAX-RBD или pVAX–PGS. Число клеток, продуцирующих IFN- γ , определяли методом ELISpot. Различия между группами, иммунизированными вакцинными конструкциями и контрольной плазмидой, были статистически значимыми (p < 0.01), а между группами, иммунизированными рVAX-RBD–PGS и pVAX-RBD, не были достоверными. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0. Данные представлены как среднее значение \pm SD. Достоверность рассчитывали с использованием непараметрического метода Манна–Уитни.

активация гуморального и клеточного иммунитета, простота изготовления, низкая стоимость, отсутствие требований к особым условиям хранения и безопасность.

К основным недостаткам ДНК-вакцин относится их низкая иммуногенность при внутримышечном введении "голой" плазмидной ДНК [9]. Для повышения эффективности доставки ДНКвакцин в антигенпрезентирующие клетки часто используют катионные полимеры, белки или липиды, способные компенсировать отрицательный заряд нуклеиновой кислоты и тем самым облегчить ее проникновение через клеточную мембрану антигенпрезентирующих клеток; иногда применяют безыгольные инжекторы и электропораторы [19–23].

Так, Smith с соавт. [8] иммунизировали мышей ДНК-конструкцией, кодирующей полноразмерный белок S, с помощью электропоратора. Однократное введение дозы, составляющей всего 2.5 мкг, индуцировало гуморальный иммунный ответ (с титром антител 1 : 1 000) и Т-клеточный ответ (1000 IFN-γ-продуцирующих клеток на 10⁶ спленоцитов). Seo с соавт. [24] также сконструировали ДНК, кодирующую S-белок и N-концевую часть тканевого активатора плазминогена в качестве лидерной последовательности. После двукратной иммунизации мышей этой ДНК-конструкцией (50 мкг) с использованием электропорации обнаружили формирование сильного специфического ответа: титры антител составили 1 : 10000, а число IFN-у-продуцирующих Т-лимфоцитов в некоторых случаях достигало 2000 на 10⁶ спленоцитов. Prompetchara с соавт. [25] также исследовали иммуногенные свойства ДНК-конструкций, кодирующих полноразмерный S-белок или два домена: S1 и S2. Иммунизацию проводили трижды с использованием электропоратора, доза ДНК составляла 100 мкг. В результате трехкратного введения каждой из этих конструкций авторы регистрировали специфические антитела (титр 1: 2000) и высокие показатели Т-клеточного ответа, особенно для ДНК-конструкции, кодирующей полноразмерный S-белок (3000 IFN-үпродуцирующих клеток на 10⁶ спленоцитов). Группа японских исследователей, Nishikawa с соавт. [26], использовала для подкожного введения мышам кандидатной ДНК-вакцины струйный инжектор Pyro-drive Jet. После трехкратной иммунизации авторы обнаружили формирование высокого уровня специфических антител, титры которых составили 1 : 10000, в то время как Т-клеточный ответ был ниже, чем для вакцинных конструкций, вводимых с использованием электропоратора (150 IFN-γ-продуцирующих клеток на 10⁶ спленоцитов *vs* 1000—3000 для электропоратора) [26]. Резюмируя вышесказанное, заметим, что использование электропорации для введения вакцинных ДНК-конструкций индуцирует у животных развитие как гуморального, так и клеточного иммунного ответа на целевой антиген. К недостаткам электропорации относится болезненность в месте инъекции и потребность в специализированных приборах, которые пока не сертифицированы для вакцинации людей.

В настоящее время несколько компаний разрабатывают ДНК-вакцины против COVID-19. Фирмы "Inovio", "AnGes" и "Zydus Cadila" приступили к стадии III клинических испытаний своих вакцин (https://www.who.int/publications/m/item/ draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines), еще восемь находятся на более ранних стадиях клинических испытаний.

Среди 10 ДНК-вакцин, находящихся на стадии клинических испытаний, большинство предлагается вводить с помощью специальных устройств и только в одном случае применяется система доставки с использованием липосом (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04591184). Для этого была специально разработана платформа Fusogenix, состоящая из смеси нейтральных липидов и малых мембранных белков, участвующих в слиянии мембран. Несмотря на то, что токсичность таких липосом сильно снижена, они все же не лишены некоторых серьезных недостатков, связанных как с природой липосом, так и с технологической сложностью транспортировки и хранения препаратов, требующие соблюдения условий холодовой цепи [16, 27].

Нами предложен новый способ доставки ДНКвакцин, заключающийся в упаковке нуклеиновой кислоты в поликатионный конъюгат полиглюкина со спермидином, названный нами PGS. Этот выбор основан на результатах, полученных нами ранее при исследовании PGS как "упаковки" для доставки в клетки вакцинных конструкций на основе нуклеиновых кислот [14–16]. PGS включен в кандидатную вакцину против ВИЧ-1 – Комби-ВИЧвак, - которая прошла фазу І клинических испытаний на безопасность [14]. PGS-содержаший препарат ДНК можно лиофилизовать (что отличает его от липосомсодержащего препарата) и хранить при 4°C не менее двух лет без потери активности. Важно, что компоненты PGS биоразлагаемы и безопасны для человека; их низкая стоимость, безопасность и возможность лиофилизации с длительным хранением дают дополнительные технологические преимущества при производстве и транспортировке вакцинного препарата.

Известно, что ДНК-вакцины, как правило, индуцируют более эффективно Т-клеточный ответ и менее эффективно В-клеточный, так как синтез и процессинг антигена, который кодирует ДНК-вакцина, происходит внутри клетки, а внутриклеточные белки презентируются связанными с молекулами МНС класса I, что приводит к активации цитотоксических Т-лимфоцитов, активность которых нацелена на устранение зараженных вирусом клеток. Для успешной зашиты от SARS-CoV-2 важно, чтобы вакцина индуцировала развитие как клеточного, так и гуморального ответа [28]. Учитывая это, мы предположили, что введение в состав иммуногена лидерной последовательности 176, гибрида сигнальных последовательностей двух активно секретируемых белков, обеспечит эффективную секрецию RBD из клетки и тем самым приведет к усилению гуморального звена иммунного ответа на вводимую ДНК-конструкцию.

Способность разработанной нами вакцинной ДНК-конструкции обеспечивать секрецию целевого белка из эукариотической клетки проанализирована на культуральной жидкости от клеток СНО-К1, трансфицированных pVAX-RBD (рис. 3).

Для получения комплексов ДНК–PGS плазмиду pVAX-RBD и конъюгат PGS смешивали в массовом соотношении 1 : 10, контролируя комплексообразование с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле (рис. 4).

При сравнении иммуногенности "голой" плазмиды, pVAX-RBD, и pVAX-RBD в оболочке PGS, pVAX-RBD—PGS, показано, что последняя эффективнее индуцирует иммунный ответ у животных. По результатам ИФА, в сыворотках животных в группе pVAX-RBD титр RBD-специфичных антител составил 1 : 1000, а в группе pVAX-RBD—PGS — 1 : 42000 (рис. 56, e). ДНКконструкция pVAX-RBD в оболочке PGS и без нее эффективно индуцировала у животных и клеточный иммунный ответ. По результатам ELISpot спленоциты иммунизированных животных эффективно продуцировали INF- γ в ответ на стимуляцию пулом пептидов из S-белка SARS-CoV-2 (рис. 6).

Таким образом, композицию pVAX-RBD в оболочке конъюгата полиглюкина со спермидином можно рассматривать как перспективную кандидатную ДНК-вакцину против COVID-19 – ее иммунологические характеристики сравнимы с таковыми для вакцинных ДНК-конструкций, испытанных на мышах [8, 24–26].

Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665). Работу с животными проводили согласно "Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных". Эксперименты были одобрены на заседании биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора (номер протокола ГНЦ ВБ "Вектор"/10-09.2020).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gao Q., Bao L., Mao H., Wang L., Xu K., Yang M., Li Y., Zhu L., Wang N., Lv Z., Gao H., Ge X., Kan B., Hu Y., Liu J., Cai F., Jiang D., Yin Y., Qin C., Li J., Gong X., Lou X., Shi W., Wu D., Zhang H., Zhu L., Deng W., Li Y., Lu J., Li C., Wang X., Yin W., Zhang Y., Qin C. (2020) Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*. 369, 77–81.
- Wang H., Zhang Y., Huang B., Deng W., Quan Y., Wang W., Xu W., Zhao Y., Li N., Zhang J., Liang H., Bao L., Xu Y., Ding L., Zhou W., Gao H., Liu J., Niu P., Zhao L., Zhen W., Fu H., Yu S., Zhang Z., Xu G., Li C., Lou Z., Xu M., Qin C., Wu G., Gao G.F., Tan W., Yang X. (2020) Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. *Cell.* 182, 39–51.
- Keech C., Albert G., Cho I., Robertson A., Reed P., Neal S., Plested J.S., Zhu M., Cloney-Clark S., Zhou H., Smith G., Patel N., Frieman M.B., Haupt R.E., Logue J., McGrath M., Weston S., Piedra P.A., Desai C., Callahan K., Lewis M., Price-Abbott P., Formica N., Shinde V., Fries L., Lickliter J.D., Griffin P., Wilkinson B., Glenn G.M. (2020) Phase 1-2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N. Engl. J. Med.* 383, 2320–2332.
- Ravichandran S., Coyle E.M., Klenow L., Tang J., Grubbs G., Liu S., Wang T., Golding H., Khurana S. (2020) Antibody signature induced by SARS-CoV-2 spike protein immunogens in rabbits. *Sci. Transl. Med.* 12, eabc3539.
- Quinlan B.D., He W., Mou H., Zhang L., Guo Y., Chang J., Peng S., Ojha A., Tavora R., Parcells M.S., Luo G., Li W., Zhong G., Choe H., Farzan M. (2020) An engineered receptor-binding domain improves the immunogenicity of multivalent SARS-CoV-2 vaccines. *bioRxiv*. 2020.11.18.388934. https://doi.org/10.1101/2020.11.18.388934
- García-Arriaza J., Garaigorta U., Pérez P., Lázaro-Frías A., Zamora C., Gastaminza P., Del Fresno C., Casasnovas J.M., Sorzano C.Ó.S., Sancho D., Esteban M. (2021) COVID-19 vaccine candidates based on modified vaccinia virus Ankara expressing the SARS-CoV-2 spike induce robust T- and B-cell immune responses and full efficacy in mice. J. Virol. 95(7), e02260-20.

https://doi.org/10.1128/JVI.02260-20

 Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. (2020) Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* **396**, 887–897.

- Smith T.R.F., Patel A., Ramos S., Elwood D., Zhu X., Yan J., Gary E.N., Walker S.N., Schultheis K., Purwar M., Xu Z., Walters J., Bhojnagarwala P., Yang M., Chokkalingam N., Pezzoli P., Parzych E., Reuschel E.L., Doan A., Tursi N., Vasquez M., Choi J., Tello-Ruiz E., Maricic I., Bah M.A., Wu Y., Amante D., Park D.H., Dia Y., Ali A.R., Zaidi F.I., Generotti A., Kim K.Y., Herring T.A., Reeder S., Andrade V.M., Buttigieg K., Zhao G., Wu J.M., Li D., Bao L., Liu J., Deng W., Qin C., Brown A.S., Khoshnejad M., Wang N., Chu J., Wrapp D., McLellan J.S., Muthumani K., Wang B., Carroll M.W., Kim J.J., Boyer J., Kulp D.W., Humeau L.M.P.F., Weiner D.B., Broderick K.E. (2020) Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nat. Commun.* **11**, 2601.
- Yu J., Tostanoski L.H., Peter L., Mercado N.B., Mc-Mahan K., Mahrokhian S.H., Nkolola J.P., Liu J., Li Z., Chandrashekar A., Martinez D.R., Loos C., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Slein M.D., Chen Y., Zuiani A., Lelis F.J.N., Travers M., Habibi S., Pessaint L., Van Ry A., Blade K., Brown R., Cook A., Finneyfrock B., Dodson A., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., He X., Jacob-Dolan C., Kirilova M., Kordana N., Lin Z., Maxfield L.F., Nampanya F., Nityanandam R., Ventura J.D., Wan H., Cai Y., Chen B., Schmidt A.G., Wesemann D.R., Baric R.S., Alter G., Andersen H., Lewis M.G., Barouch D.H. (2020) DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science.* 369, 806–811.
- Walsh E.E., Frenck R.W. Jr, Falsey A.R., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Neuzil K., Mulligan M.J., Bailey R., Swanson K.A., Li P., Koury K., Kalina W., Cooper D., Fontes-Garfias C., Shi P.Y., Türeci Ö., Tompkins K.R., Lyke K.E., Raabe V., Dormitzer P.R., Jansen K.U., Şahin U., Gruber W.C. (2020) Safety and immunogenicity of two RNA-based Covid-19 vaccine candidates. *N. Engl. J. Med.* 383, 2439–2450.
- Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Diemert D., Spector S.A., Rouphael N., Creech C.B., McGettigan J., Khetan S., Segall N., Solis J., Brosz A., Fierro C., Schwartz H., Neuzil K., Corey L., Gilbert P., Janes H., Follmann D., Marovich M., Mascola J., Polakowski L., Ledgerwood J., Graham B.S., Bennett H., Pajon R., Knightly C., Leav B., Deng W., Zhou H., Han S., Ivarsson M., Miller J., Zaks T. (2021) Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 384, 403–416.
- Verdecchia P., Cavallini C., Spanevello A., Angeli F. (2020) The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Intern. Med.* 76, 14–20.
- Karpenko L.I., Lebedev L.R., Bazhan S.I., Korneev D.V., Zaitsev B.B., Ilyichev A.A. (2017) Visualization of CombiHIVvac vaccine particles using electron microscopy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 33, 323–324.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

- 14. Карпенко Л.И., Бажан С.И., Богрянцева М.П., Рындюк Н.Н., Гинько З.И., Кузубов В.И., Лебедев Л.Р., Каплина О.Н., Регузова А.Ю., Рыжиков А.Б., Усова С.В., Орешкова С.Ф., Нечаева Е.А., Даниленко Е.Д., Ильичев А.А. (2016) Комбинированная вакцина против ВИЧ-1 на основе искусственных полиэпитопных иммуногенов: результаты І фазы клинических испытаний. Биоорган. химия. 42, 191–204.
- Karpenko L.I., Apartsin E.K., Dudko S.G., Starostina E.V., Kaplina O.N., Antonets D.V., Volosnikova E.A., Zaitsev B.N., Bakulina A.Y., Venyaminova A.G., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. (2020) Cationic polymers for the delivery of the Ebola DNA vaccine encoding artificial T-cell immunogen. *Vaccines.* 8, 718.
- 16. Karpenko L.I., Rudometov A.P., Sharabrin S.V., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Bazhan S.I., Volosnikova E.A., Rudometova N.B., Orlova L.A., Pyshnaya I.A., Zaitsev B.N., Volkova N.V., Azaev M.S., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Ilyichev A.A. (2020) Delivery of mRNA vaccine against SARS-CoV-2 using a polyglucin:spermidine conjugate. *Vaccines.* 9, 76.
- Reed L.J., Muench H. (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27(3), 493–497.

https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408

- Brito L.A., Singh M. (2011) Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. J. Pharm. Sci. 100, 34–37.
- Milani A., Bolhassani A., Heshmati M. (2017) Delivery of HIV-1 Nef linked to heat shock protein 27 using a cationic polymer is more effective than cationic lipid in mammalian cells. *Bratisl. Lek. Listy.* 118, 334–338.
- Saljoughian N., Zahedifard F., Doroud D., Doustdari F., Vasei M., Papadopoulou B., Rafati S. (2013) Cationic solid-lipid nanoparticles are as efficient as electroporation in DNA vaccination against visceral leishmaniasis in mice. *Parasite Immunol.* 35, 397–408.
- Jiang J. (2021) Cell-penetrating peptide-mediated nanovaccine delivery. *Curr. Drug Targets.* 22(8), 896–912. https://doi.org/10.2174/1389450122666210203193225
- 22. Akhtar N., Singh V., Yusuf M., Khan R.A. (2020) Noninvasive drug delivery technology: development and current status of transdermal drug delivery devices,

techniques and biomedical applications. *Biomed Tech.* **65**, 243–272.

 Tebas P., Yang S., Boyer J.D., Reuschel E.L., Patel A., Christensen-Quick A., Andrade V.M., Morrow M.P., Kraynyak K., Agnes J., Purwar M., Sylvester A., Pawlicki J., Gillespie E., Maricic I., Zaidi F.I., Kim K.Y., Dia Y., Frase D., Pezzoli P., Schultheis K., Smith T.R.F., Ramos S.J., McMullan T., Buttigieg K., Carroll M.W., Ervin J., Diehl M.C., Blackwood E., Mammen M.P., Lee J., Dallas M.J., Brown A.S., Shea J.E., Kim J.J., Weiner D.B., Broderick K.E., Humeau L.M. (2021) Safety and immunogenicity of INO-4800 DNA vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of an openlabel, phase 1 clinical trial. *EClinicalMedicine*. 31, 100689. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100689

See V.P. Sub V.S. Buy I.L. Jong H. Ob H. Ko

- Seo Y.B., Suh Y.S., Ryu J.I., Jang H., Oh H., Koo B.S., Seo S.H., Hong J.J., Song M., Kim S.J., Sung Y.C. (2021) Soluble spike DNA vaccine provides long-term protective immunity against SARS-CoV-2 in mice and nonhuman primates. *Vaccines.* 9, 307.
- 25. Prompetchara E., Ketloy C., Tharakhet K., Kaewpang P., Buranapraditkun S., Techawiwattanaboon T., Sathean-Anan-Kun S., Pitakpolrat P., Watcharaplueksadee S., Phumiamorn S., Wijagkanalan W., Patarakul K., Palaga T., Ruxrungtham K. (2021) DNA vaccine candidate encoding SARS-CoV-2 spike proteins elicited potent humoral and Th1 cell-mediated immune responses in mice. *PLoS One.* 16, e0248007.
- 26. Nishikawa T., Chang C.Y., Tai J.A., Hayashi H., Sun J., Torii S., Ono C., Matsuura Y., Ide R., Mineno J., Sasai M., Yamamoto M., Nakagami H., Yamashita K. (2021) Anti-CoVid19 plasmid DNA vaccine induces a potent immune response in rodents by Pyro-drive Jet Injector intradermal inoculation. *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2021.01.13.426436
- Chang H.I., Yeh M.K. (2012) Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int. J. Nanomedicine.* 7, 49–60.
- 28. Lagunas-Rangel F.A, Chávez-Valencia V. (2021) What do we know about the antibody responses to SARS-CoV-2? *Immunobiology*. **226**, 152054.

IMMUNOGENICITY OF A DNA VACCINE CODING A RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE SARS-CoV-2 S PROTEIN

M. B. Borgoyakova^{1, *}, L. I. Karpenko¹, A. P. Rudometov¹, D. V. Shanshin¹, A. A. Isaeva^{1, 2},
V. S. Nesmeyanova^{1, 2}, N. V. Volkova¹, S. V. Belenkaya¹, D. E. Murashkin¹, D. N. Shcherbakov^{1, 2},
E. A. Volosnikova¹, E. V. Starostina¹, L. A. Orlova¹, N. V. Danilchenko¹,
A. V. Zaikovskaya¹, O. V. Pyankov¹, and A. A. Ilyichev¹

¹ State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia
² State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rospotrebnadzor, World-Class Genomic Research Center for Biological Safety and Technological Independence, Federal Scientific and Technical Program on the Development of Genetic Technologies, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

*e-mail: borgoyakova_mb@vector.nsc.ru

The COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus has made the development of a preventive vaccine extremely relevant. Here, the construction of a candidate DNA vaccine (pVAX-RBD) against SARS-CoV-2 carrying the receptor-binding domain (RBD) sequence of S protein is described. A unique signal se-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

БОРГОЯКОВА и др.

quence was included that promotes protein secretion into the extracellular region to increase the efficiency of inducing a humoral immune response. A polyglucin-spermidine conjugate (PGS) was used to deliver the pVAX-RBD. A comparative study of the immunogenicity of naked pVAX-RBD and pVAX-RBD in the PGS envelope showed that the second more effectively induced an immune response in immunized mice. The titers of RBD-specific antibodies in ELISA were 1 : 1000 for animals of the pVAX-RBD group, and 1 : 42000 for the pVAX-RBD–PGS group. The pVAX-RBD–PGS effectively induced a cellular response. Using the ELISpot method, we showed that splenocytes of immunized animals efficiently produced INF- γ in response to stimulation by a pool of peptides derived from S protein. The results suggest that the pVAX-RBD composition in the envelope of the polyglucin-spermidine conjugate can be considered as a promising DNA vaccine against COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2, DNA vaccine, immune response, mice

—— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 576.315.42,593.17

УПАКОВКА МОЛЕКУЛ ДНК СУБХРОМОСОМНОГО РАЗМЕРА В ХРОМАТИНОВЫХ ТЕЛЬЦАХ МАКРОНУКЛЕУСОВ ИНФУЗОРИЙ

© 2021 г. О. Г. Леонова^{*a*}, А. А. Потехин^{*b*, *c*}, И. В. Некрасова^{*b*}, Б. П. Караджян^{*d*}, Б. В. Сёмин^{*e*}, В. С. Прасолов^{*a*}, В. И. Попенко^{*a*}, *

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия ^bCанкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, кафедра микробиологии, Cанкт-Петербург, 199034 Россия

^сЗоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^dИнститут цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064 Россия

^еПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119435 Россия

> **e-mail: popenko@eimb.ru* Поступила в релакцию 31.03.2021 г.

После доработки 11.05.2021 г. Принята к публикации 12.05.2021 г.

Принципиальное отличие соматических ядер (макронуклеусов) инфузорий от клеточных ядер высших эукариот состоит в том, что геном макронуклеуса представлен огромным числом (до десятков и сотен тысяч) минихромосом генного (0.5–25 т.п.н.) или субхромосомного (до 2000 т.п.н.) размера. Методом электронной микроскопии показано, что на стадии интерфазы хроматин макронуклеусов обычно имеет вид хроматиновых телец, или тяжей, толщиной 200-300 нм. Однако открытым остается вопрос о количестве молекул ДНК в индивидуальных хроматиновых тельцах. Нами изучена организация хроматина в макронуклеусах инфузории Didinium nasutum и трех видов Paramecium sp, отличающихся по пульс-электрофоретическому кариотипу, а также соответствие организации хроматина соматических ядер модели топологически ассоциированных доменов в ядрах высших эукариот. С помощью пульс-электрофореза показано, что размеры ДНК макронуклеуса изученных вилов лежат в лиапазоне 50–1700 т.п.н., олнако основная часть молекул имеет ллину менее 500 т.п.н. Сравнительный количественный анализ данных пульс-электрофореза и электронной микроскопии показал, что на стадии логарифмического роста культуры хроматиновые тельца P. multimicronucleatum содержат по одной минихромосоме, в то время как тельца в макронуклеусе D. nasutum – две и более молекул ДНК. Однако при снижении активности макронуклеусов при голодании хроматиновые тельца агрегируют, что приводит к увеличению их размера и/или формированию 200-300 нм фибрилл, состоящих из нескольких хроматиновых телец. Предложена модель формирования таких структур. Показано, что по топологическим характеристикам хроматиновые тельца в макронуклеусах инфузорий с субхромосомным размером ДНК соответствуют топологически-ассоциированным доменам высших эукариот.

Ключевые слова: хроматин, инфузории, макронуклеус, пульс-электрофорез, электронная микроскопия, топологически-ассоциированные домены

DOI: 10.31857/S0026898421060082

введение

Архитектура клеточного ядра и пространственная организация структур хроматина в ядре являются важными факторами, определяющими функционирование клеточного генома [1, 2]. Более того, осознание важности пространственной организации хроматина в ядре для обеспечения активации-репрессии больших групп генов и ее связи с возникновением различных заболеваний привело к появлению нового направления — 3D геномики [3].

Вопрос о компактизации ДНК в хромосомах и в структурах интерфазного хроматина изучают на протяжении многих лет. Ранние биохимические и электронно-микроскопические исследования выявили в структуре хроматина петли размером ~

Сокращения: ТАД – топологически-ассоциированный домен, ПЭФ – пульс-электрофорез, TeBP – белок, связывающий теломеры.

100 т.п.н. (обзор [4]). Изучены последовательности ДНК, лежащих в основании таких петель, которые получили название SAR/MAR (Scaffold/ Matrix Attached Regions), поскольку предполагалось, что они связаны с белками скаффолда, или ядерного матрикса [5-7]. Предложен ряд моделей компактизации ДНК в метафазных хромосомах, среди которых можно выделить радиально-петельную модель, привлекательную простотой интерпретации [8], модель иерархии спиралей [9], а также модель дискретных уровней организации хроматина [10, 11]. Последняя модель предполагала существование нескольких уровней компактизации хроматина в ядре (нуклеосомы-нуклеосомные фибриллы-нуклеомеры-20-30 нм фибриллыхромомеры-хромонемы-хромосома) и хорошо согласовывалась с рядом биохимических и электронно-микроскопических данных [10, 11].

Однако за последние 10-15 лет получены данные, которые поставили под сомнение существование ядерного матрикса как интактной структуры в клеточном ядре [12]. Кроме того, методами криоэлектронной микроскопии не обнаружено наднуклеосомных уровней организации хроматина ни в интерфазных клетках высших эукариот, ни в метафазных хромосомах [13, 14]. Предполагается. что наднуклеосомные структуры. визуализированные на электронно-микроскопических препаратах, являются артефактами фиксации, в частности, в присутствии ионов двухвалентных металлов [14]. Развитие молекулярных методов исследования организации ядра (Hi-C) позволило получить карты распределения контактов между разными участками геномной ДНК в ядрах различных эукариотических клеток, фиксированных формальдегидом [15, 16]. Полученные данные позволили предложить новую концепцию организации хроматина в ядрах высших эукариот, согласно которой нуклеосомные фибриллы хроматина сами формируют пространственную конфигурацию хроматина в ядре за счет взаимодействия разных участков самой нуклеосомной фибриллы, энтропийных сил, краудинга и других слабых взаимодействий [17, 18]. Формируемые при этом топологически-ассоциированные домены (ТАДы) содержат в основном неактивный хроматин. Согласно этой модели транскрипция происходит либо на развернутых участках хроматина в интерТАДах, либо на поверхности ТАДов. ТАДы обнаружены у млекопитающих, насекомых и птиц, но отсутствуют у бактерий [18].

Инфузории — уникальные биологические объекты, которые обладают истинным ядерным дуализмом. Каждая клетка инфузорий содержит ядра двух типов: генеративные, транскрипционнонеактивные микронуклеусы и (обычно одно) крупное соматическое ядро — макронуклеус, обеспечивающее функционирование клетки на протяжении вегетативного цикла. Макронуклеус формируется в результате полового процесса. После слияния двух пронуклеусов в зачатке макронуклеуса происходят сложные биохимические процессы, включающие амплификацию ДНК, рестрикцию, элиминацию части хроматина и достраивание теломерных последовательностей на фрагментированных отрезках ДНК. В результате геном макронуклеуса представлен большим (от нескольких сотен до нескольких тысяч) набором минихромосом (см. обзоры [19-21]). Всех инфузорий можно грубо подразделить на две большие группы: виды с "генным" размером молекул ДНК макронуклеуса (обычно от 0.5 до 25 т.п.н.) и виды с "субхромосомными" молекулами ДНК макронуклеуса, размер которых составляет от нескольких десятков до нескольких сотен т.п.н. [21]. Типичной формой организации хроматина в интерфазных макронуклеусах инфузорий с субхромосомным размером ДНК являются хроматиновые тельца размером ~ 0.1-0.2 мкм [20].

Электронно-микроскопические данные, полученные при изучении декомпактизации хроматиновых телец в гипотонических растворах, показали, что нуклеосомные фибриллы организованы в них по радиально-петельному принципу [22-24] и могут рассматриваться как аналоги хромомеров в хромосомах высших эукариот [25]. Однако в настоящее время нет точных данных о том, сколько молекул ДНК находится в каждом хроматиновом тельце. Цель настоящей работы состояла в том, чтобы, используя данные пульс-электрофореза и электронной микроскопии, определить, как организованы молекулы ДНК в хроматиновых тельцах макронуклеусов с "субхромосомной" организацией генома, и выяснить, в какой мере организация хроматина соматических ядер соответствует модели ТАДов в ядрах высших эукариот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток. Инфузории Paramecium multimicronucleatum, P. tetraurelia и P. quadecaurelia получены из коллекции культур инфузорий RC CCM Ресурсного Центра "Культивирование микроорганизмов" СПбГУ. Инфузорий культивировали по стандартным методикам [26] на салатной среде, инокулированной бактериями Klebsiella aerogenes.

Инфузории *Didinium nasutum* ("Sciento", Великобритания) выращивали при комнатной температуре в кипяченой водопроводной воде. В качестве корма использовали *P. caudatum*, культивируемые отдельно. Чтобы добиться снижения активности соматического ядра, клетки пересаживали в среду без корма, препараты готовили через 36—48 ч после исчезновения остатков пищи внутри инфузорий.

Пульс-электрофорез проводили согласно [27, 28]. Для выделения ДНК культуры инфузорий отмывали от питательной среды и оставляли голодать до исчезновения содержимого из пищеварительных вакуолей. Клетки (10⁴-10⁵) осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 мин. концентрируя в объеме 0.3-0.5 мл. Суспензию клеток смешивали в соотношении 1:1 с нагретой до 50°С 1.5%-ной агарозой SeaKem ("FMC Corp.", США). приготовленной на 0.125 M EDTA. pH 8.0. и формировали агарозные блоки, как описано в [28]. Блоки помещали в лизирующий буфер (0.5 М EDTA, pH 9.5; 10% лаурилсаркозината натрия; 100 мг/мл протеиназы К ("Sigma Chem. Co.", США)) и инкубировали в течение 48 ч при 55°С. Полученные блоки хранили в лизирующем буфере при 4°С. В качестве маркеров использовали конкатемеры ДНК фага λ ("New England Bio-Labs", США), хромосомы дрожжей Saccharomyces cerevisiae штамм 15V-P4 [29] и хромосомы S. cerevisiae (CHEF DNA Size Marker #170-3605; "Bio-Rad Laboratories", Германия).

Для проведения ПЭФ использовали прибор авторской конструкции [27] с углом переориентации двух электрических полей 120°. Гели толщиной 4 мм из 1%-ной SeaKem агарозы ("FMC Corp.") готовили на 0.5× TBE-буфере (45 мМ Трис, 45 мМ борная кислота, 2 мМ EDTA, pH 8.0). Электрофорез проводили в том же буфере при температуре 14–16°С. Режимы пульсации и длительность периода каждого времени пульса выбирали в соответствии с данными [27, 28]. Затем гели окрашивали в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл). Для количественной обработки использовали две–пять электрофореграмм, полученных в разных режимах.

Электронная микроскопия. Интерфазные клетки на стадии логарифмического роста культуры фиксировали в растворе 2.5%-ного глутаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере рН 7.3 в течение 1 ч при комнатной температуре, дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации и заключали в смесь эпон-аралдита по стандартной методике. Срезы толщиной 50-70 нм получали на ультратоме LKB III ("LKB", Швеция) и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по стандартной методике. Препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-100CX ("JEOL", Япония), находящемся в ЦКП "Коллекция UNIQEM" ФИЦ Биотехнологии РАН при ускоряющем напряжении 80 кВ. Калибровку увеличения проводили с помощью частиц латекса диаметром

109 ± 3 нм ("Serva", Германия) или дифракционной решетки 2160 линий/мм. Негативы (увеличение ×10000) сканировали с конечным разрешением 480 пикселей на 1 мкм среза. Для определения диаметра телец измеряли площадь S каждого отдельного тельца с помощью программы ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij) и рассчитывали его диаметр (Dxt) как Dxt = $(4S/\pi)^{1/2}$.

Построение гистограмм распределения молекул ДНК по длинам. ПЭФ гель фотографировали на изопанхроматическую пленку "Микрат-300". Пленку проявляли в стандартном проявителе СТ1. Оптическую плотность (*OD*) измеряли с помощью сканера Epson Perfection Photo 3200, откалиброванного с помощью спектрофотометра Сагу 100SCAN ("Varian", США), в режиме без программной коррекции ("no ICM mode").

Характеристическая кривая фотопленки "Микрат 300" имела типичную для негативных пленок S-образную форму с *ОD*_{вуали} = 0.15-0.18 (рис. 1). Максимальное значение *OD* составило 2.8-3.0. Для количественной оцифровки использовали микрофотографии не перегруженных гелей с OD = 0.3 - 2.3, находящейся на линейном участке характеристической кривой, где зависимость ОД от логарифма световой экспозиции (т.е. количества освещения, лк/с) Н описывается уравнением $OD = \gamma lgH + b$, где b — постоянная величина, характеризующая свойства фотопленки и условия проявления, ү – коэффициент контраста. Экспозиция H есть сумма H_{фон} (фоновой экспозиции от геля) и $H_{\text{дHK}}$ – экспозиции от ДНК. При этом $H_{\text{дHK}}$ = *NL* α , где *L* – длина молекул ДНК (т.п.н.), α – экспозиция от 1 т.п.н. ДНК, *N* – количество молекул длиной L. Следовательно, значение фоновой ОД геля вне дорожек равно:

$$OD_{\phi o H} = \gamma \lg H_{\phi o H} + b,$$
 (1)

а на дорожках с ДНК

$$OD = \gamma \lg(H_{\phi o \mu} + H_{\Pi HK}) + b =$$

= $\gamma \lg(H_{\phi o \mu} + NL\alpha) + b.$ (2)

Из формул (1) и (2) следует, что $N = \frac{H_{\phi o H}}{L\alpha} \left(10^{\frac{OD-OD_{\phi o H}}{\gamma}} - 1 \right)$. Отсюда относительное

(нормированное) распределение молекул ДНК по длинам определяется по формуле

$$\frac{N}{N\text{max}} = \frac{L\text{max}}{L} \left[\left(10^{\frac{OD-OD_{\text{фон}}}{\gamma}} - 1 \right) \right] / \left(10^{\frac{OD_{\text{max}}-OD_{\text{фон}}}{\gamma}} - 1 \right) \right],$$

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021



Рис. 1. Характеристическая кривая фотопленки "Микрат-300", проявленной до коэффициента контраста γ = 2. По оси абсцисс – логарифм освещенности Н (лк×с), по оси ординат – оптическая плотность пленки. Но – произвольно выбранная для измерений точка начала отсчета освещенности. Коэффициент контраста γ равен тангенсу угла наклона прямолинейного участка характеристической кривой.

где Lmax и ODmax обозначают длину молекул и OD участка геля, соответствующего молекулам, присутствующим в ядре в максимальном количестве Nmax.

Размер молекул ДНК, содержащихся в одном хроматиновом тельце, оценивали, аппроксимируя хроматиновые тельца и нуклеосомы сферами соответствующего размера. Тогда длина ДНК в одном хроматиновом тельце *L*хт будет равна:

$$Lxt = k \cdot Lнукл \cdot (Vxt/Vнукл) =$$
$$= k \cdot Lнукл \cdot (Dxt/Dнукл)^{3} = 1.48 \times 10^{-4} Dxt^{3},$$

или

$$DxT = (6757LxT)^{1/3}$$

где Lнукл = 0.2 т.п.н. — размер ДНК в нуклеосоме [30], диаметр нуклеосомы Dнукл = 10 нм [31], k — коэффициент упаковки, Dхт (нм) — диаметр хроматинового тельца.

Учитывая, что нуклеосомы плотно упакованы в хроматиновых тельцах [32], использовали коэффициент упаковки k = 0.74 (из хорошо известной математической задачи "о плотной упаковке апельсинов в бочке" [33]).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на инфузориях *D. na*sutum, *P. tetraurelia*, *P. quadecaurelia*, и *P. multimicronu*cleatum. Результаты ПЭФ ДНК исследованных видов инфузорий приведены на рис. 2, а распределение *OD* вдоль дорожек – на рис. 3*a*, *b*, *d*, *ж*. Как показано ранее на инфузориях *Paramecium* [27], распределение блоков, полос и/или участков различной плотности в спектре отражает частоту и распределение сайтов фрагментации хромосом микронуклеуса при формировании нового макронуклеуса и является характерной особенностью каждого конкретного вида парамеций.

Наиболее широкий спектр молекул ДНК выявлен у *P. multimicronucleatum* (~50-1700 т.п.н.) видны полосы, а также участки с разной величиной ОД. В области 1300-1700 т.п.н хорошо выражены два широких пика. У близкородственных видов P. tetraurelia и P. quadecaurelia диапазоны размеров фрагментов ДНК и картины распределения OD были схожими. Основная часть молекул располагается в диапазоне длин от ~50 до 1100 т.п.н. На фоне непрерывного спектра заметны отдельные блоки и полосы. Полученные картины ПЭФ хорошо совпадают с данными, полученными методами ПЭФ и секвенирования генома макронуклеуса [27, 28, 34]. Это подтверждает вывод о стабильности молекулярной композиции генома макронуклеуса у разных видов инфузорий и возможности использования ПЭФ для получения характерного электрокариотипа данного вида.

Фрагменты ДНК *D. nasutum* в гелях ПЭФ образуют непрерывный спектр в диапазоне ~ 50– 1000 т.п.н. *ОD* вдоль дорожки, начиная с 50 т.п.н., постепенно увеличивается и выходит на плато в диапазоне около 250 т.п.н. После участка с максимальной *OD* (диапазон длин ДНК 250–400 т.п.н.) *OD* быстро уменьшается. В отличие от представленных выше ПЭФ-кариотипов видов *Parame*-



Рис. 2. Результаты пульс-электрофоретического разделения ДНК Paramecium multimicronucleatum, P. tetraurelia, P. quadecaurelia, Didinium nasutum.

cium, в которых хорошо различимы отдельные зоны и полосы, в кариотипе *D. nasutum* отдельные полосы не различаются, что указывает на отсутствие в его макронуклеусе гиперамплифицированных молекул ДНК с одинаковой длиной.

Следует отметить, однако, что распределение *ОD* вдоль дорожек гелей ПЭФ не дает корректного представления о распределении числа молекул ДНК по длине. Действительно, рассмотрим два участка одной и той же дорожки геля с одинаковой *OD*, которые соответствуют разным длинам молекул ДНК L1 и L2 (L1 > L2). Тогда число пар нуклеотидов в них будет одинаковым, но число отдельных молекул ДНК будет больше в участке. соответствующем L2. Поэтому на основании данных ПЭФ, используя калибровочные кривые сканера и фотопленки (см. "Экспериментальную часть"), мы построили нормированные спектры распределения по длинам молекул ДНК макронуклеуса (рис. 36, e, e, 3). При анализе учитывали, что молекулы размером более ~1700 т.п.н. представляют ДНК микронуклеусов [27]. Кроме того, известно, что у Paramecium молекулы ДНК длиной ~ 50 и ~ 100 т.п.н. соответствуют мтДНК [35-37]. В связи с этим пики в области 50 и

100 т.п.н. аппроксимировали распределением Гаусса и вычитали из общего спектра.

Как видно из рис. 3, распределения молекул ДНК макронуклеусов по размерам оказались существенно отличными от распределения *OD* вдоль дорожек гелей. Спектры распределения молекул ДНК по длинам несимметричны и смещены в область более коротких молекул: во всех исследованных инфузориях подавляющая часть ДНК макронуклеуса представлена молекулами размером менее 500 т.п.н.

Электронные микрофотографии интерфазных макронуклеусов инфузорий на стадии логарифмического роста культуры показаны на рис. 4. На ультратонких срезах видно, что молекулы ДНК макронуклеусов упакованы в структуры хроматина, имеющие вид более или менее округлых телец. Гистограммы размеров хроматиновых телец показаны на рис. 5. Средний диаметр составляет 139 ± 26, 143 ± 30, 136 ± 25 и 155 ± 31 нм у *P. multimicronucleatum, P. tetraurelia, P. quadecaurelia* и *D. nasutum* соответственно (n = 1000-1100). Важно отметить, что использованные для электронной микроскопии фиксаторы не содержали двухвалентных катионов. Добавление в фиксаторы 1 мМ MgCl₂ не приводило к изменению морфологии и рас-



Рис. 3. Обработка результатов пульс-электрофореза ДНК. Распределение величин *OD* вдоль дорожек гелей (*a*, *в*, *d*, *ж*) и нормированное распределение молекул ДНК макронуклеусов (*N*/*N*max) по размерам (*б*, *e*, *e*, *3*) *P. multimicronucleatum* (*a*, *б*), *P. tetraurelia* (*b*, *e*), *P. quadecaurelia* (*d*, *e*), *D. nasutum* (*ж*, *3*). По оси абсцисс – размер ДНК в т.п.н.

пределения хроматиновых телец по размерам. Например, у *P. multimicronucleatum* средний размер телец, измеренный на препаратах, фиксированных без двухвалентных катионов и в присутствии MgCl₂, составил 139 ± 26 и 138 ± 28 нм соответственно. Этот результат хорошо согласуется с известными данными о плотной упаковке нуклеосом в хроматиновых тельцах инфузорий [32]. Это позволяет, зная длину молекулы ДНК макронуклеуса, определить диаметр хроматинового тельца, в котором она компактизована. Предполагая, что каждое хроматиновое тельце содержит одну плотноупакованную молекулу ДНК, по полученным спектрам длин ДНК в макронуклеусах (рис. 3) мы построили ожидаемые из данных ПЭФ распределения хроматиновых телец по размерам и сравнили их с гистограммами размеров телец, определенных электронно-микроскопически (рис. 5).

На рис. 5*а* мы видим хорошее совпадение обоих распределений у *P. multimicronucleatum*, что указывает на то, что каждое хроматиновое тельце содержит только одну минихромосому. Напротив, сильное расхождение гистограмм на рис. 5*е* свидетельствует о том, что большинство телец в макронуклеусе *D. nasutum* содержат две или более минихромосомы. Промежуточная картина наблюдается в макронуклеусах *P. tetraurelia*, *P. quadecaurelia* (рис. 5*б*, *в*).

Следует отметить, что при определении размеров мы измеряли одиночные хроматиновые тельца с хорошо различимым контуром и не учитывали структуры, которые выглядели как агрегаты из нескольких сближенных телец. Очевидно, что такие труктуры образованы несколькими минихромосомами.

Морфология структур хроматина в макронуклеусах меняется при культивировании инфузорий в условиях голодания, когда активность макронуклеуса снижается. Эти изменения происходят в двух направлениях: хроматиновые тельца несколько увеличиваются в размере, а также агрегируют с образованием крупных структур, часто имеющих вид фибрилл толщиной 200-300 нм. На рис. 6 представлены микрофотографии хроматиновых структур в макронуклеусах P. multimicronucleatum и D. nasutum после голодания в течение 48 ч. Средний размер хроматиновых телец *Р. multimicronucleatum* vвеличивается с 139 ± 26 нм в условиях логарифмического роста культуры до 153 ± 31 нм при голодании. Хорошо видно образование крупных структур, формирующихся из двух и более хроматиновых телец (рис. 6а). Таких структур значительно больше, чем в макронуклеусах тех же инфузорий, но культивируемых в оптимальных условиях. В макронуклеусах D. nasutum появляется большое количество фибрилл толшиной 200-300 нм. состояших из двух-пяти сближенных телец (рис. 66). При этом транскрипционная активность в таких структурах хроматина сохраняется. На рис. 6в, г показаны микрофотографии срезов макронуклеусов *D. nasutum* при оптимальных условиях культивирования и в условиях голодания, контрастированных по методу Bernhard [38]. При этом контрастируются РНП-структуры, а ДНК-содержащие структуры клетки остаются неокрашенными. Хорошо видно, что РНП-структуры выявляются на поверхности хроматиновых телец, между ними и на поверхности 200-300 нм фибрилл. При этом транскрипция происходит не равномерно по всей поверхности телец и фибрилл, а в отдельных локусах (рис. 6в, г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные ПЭФ показывают, что все исследованные инфузории относятся к видам с "субхромосомным" размером молекул генома макронуклеуса. Размеры молекул ДНК варьируют от ~50 до ~1000–1100 т.п.н. у *P. tetraurelia, P. quadecaurelia* и *D. nasutum*, до ~ 1700 т.п.н. и более у *P. multimicro*-



Рис. 4. Электронно-микроскопические срезы макронуклеусов *P. multimicronucleatum* (*a*), *P. tetraurelia* (*б*), *P. quadecaurelia* (*в*), *D. nasutum* (*г*). N – ядрышки. Масштабный отрезок 1 мкм.

nucleatum, что хорошо согласуется с данными [27]. Однако распределение молекул ДНК по длинам несимметрично и смещено в область коротких молекул ~50-500 т.п.н. (рис. 3б, г, е, з). Можно высказать предположение, что такое распределение молекул ДНК связано с расщеплением более длинных фрагментов в процессе приготовления препаратов для ПЭФ. Однако, во-первых, наблюдаемые нами паттерны распределения *OD* в гелях ПЭФ хорошо согласуются с описанными в ряде других работ [27, 28]. Во-вторых, показано хорошее совпадение данных ПЭФ с длинами скаффолдов ДНК макронуклеуса *P. tetraurelia*, полученными при секвенировании [28, 34], что невозможно при неспецифической деградации макронуклеарной ДНК в ходе выделения.

В макронуклеусах молекулы ДНК организованы в хроматиновые тельца, схожие по организации с хромомерами в хромонемах эукариотических хромосом [9, 36–38]. Заметим, что в последние годы появились работы, в которых утверждают, что структуры более высокого уровня организации, чем нуклеосомные фибриллы, выявЛЕОНОВА и др.



Рис. 5. Гистограммы размеров хроматиновых телец (сплошные линии), измеренных на ультратонких срезах *P. multimicronucleatum* (*a*), *P. tetraurelia* (*б*), *P. quadecaurelia* (*в*), *D. nasutum* (*г*). Точечные линии – ожидаемые распределения размеров хроматиновых телец по данным пульс-электрофореза (рис. 3) при условии, что каждое тельце содержит одну молекулу ДНК. По оси абсцисс – диаметры телец, нм.



Рис. 6. Структура хроматина в макронуклеусах *P. multimicronucleatum* при голодании (*a*), в макронуклеусах *D. nasutum* при голодании (*b*, *c*) и в оптимальных условиях культивирования (*b*). *b*, *c* – Дифференциальное контрастирование нуклеиновых кислот по Bernhard [38]. При голодании наблюдается укрупнение хроматиновых телец, образование агрегатов из нескольких телец (головки стрелок), образование коротких фибрилл (двойные стрелки). Одиночными стрелками показаны структуры РНП на поверхности телец и фибрилл хроматина. N – ядрышки. Масштабный отрезок – 1 мкм.

ляются на электронно-микроскопических препаратах вследствие артефактов фиксации, в частности, в присутствии двухвалентных катионов [12, 13]. Однако это не так в случае хроматина макронуклеусов инфузорий. Так, все представленные в работе микрофотографии получены при фиксации без двухвалентных катионов, причем добавление 1 мМ MgCl₂ не приводило к изменению размеров телец. Более того, хроматиновые тельца наблюдали и при фиксации параформальдегидом без двухвалентных катионов и на оптическом уровне [20].

1006

Сравнение размеров хроматиновых телец, измеренных на ультратонких срезах, и ожидаемых размеров, определенных из данных ПЭФ, показывает, что количество молекул ДНК в хроматиновых тельцах разных видов различается. Так, у *P. multimicronucleatum* индивидуальные тельца содержат только одну молекулу ДНК (распределения совпадают, рис. 5*a*), в то время как большинство телец в макронуклеусе *D. nasutum* содержат две минихромосомы или более (рис. 5*c*), что следует из значительного расхождения распределений размеров хроматиновых телец, ожидаемых из результатов ПЭФ и измеренных на срезах.

Такое расхождение не может объясняться неточным вычислением ожилаемого размера телец на основе данных ПЭФ. Плотная упаковка нуклеосом в хроматиновых тельцах подтверждается как электронно-микроскопическими данными по негативному контрастированию хроматиновых телец [33], так и тем фактом, что размеры телец, измеренные нами на ультратонких срезах, не изменялись при добавлении в фиксатор 1 мМ MgCl₂. В расчетах мы аппроксимировали нуклеосомные тельца сферами радиусом 10 нм [30], объем которых больше суммарного объема гистонового кора нуклеосомы и навитой на него нуклеосомной ДНК [39], поэтому ясно, что расхождение распределений у D. nasutum не может быть меньше, чем представленное на рис. 5г, т.е. большинство телец в макронуклеусе D. nasutum содержат несколько минихромосом.

В соматических ядрах *P. tetraurelia* и *P. quadecaurelia* на стадии логарифмического роста культуры наблюдается промежуточная картина. Основная часть хроматиновых телец, по-видимому, содержит одну молекулу ДНК. Однако сравнение распределений размеров телец, полученных из данных ПЭФ и электронной микроскопии (рис. 5*в*, *г*), показывает наличие несовпадающего "крыла" в левой части распределений. То есть некоторая часть телец содержит две и более молекулы ДНК. Такие тельца могут образовываться при агрегации двух и более телец, содержащих по одной молекуле ДНК.

Как структурно организована ДНК в хроматиновых тельцах? Электронно-микроскопически показано, что в гипотонических условиях хроматиновые тельца макронуклеусов инфузорий *Bursaria truncatella, D. nasutum, Paramecium, Spirotricha* декомпактизуются с образованием петель фибрилл хроматина вокруг электронно-плотного центра [22–24]. Murti K.G и Prescott D.M. [41, 42] показали, что концевые участки ДНК макронуклеуса *Stylonychia lemnae*, содержащие длинные теломерные повторы, при взаимодействии с теломер-связывающими белками (TeBP) образуют между собой стабильные комплексы. Такие структуры, находящиеся в основании петель фибрилл хроматина, разрушались при обработке протеиназой К [40, 41]. В работах сотрудников лаборатории Lipps H.J. [42] также установлено наличие квадруплексов концевых участков ДНК макронуклеуса в комплексе с TeBP, получены антитела к этим структурам [43]. На препаратах хроматина *B. truncatella*, распластанного в присутствии 70%-ного формамида на поверхности гипофазы из дистиллированной воды, электронно-микроскопически визуализированы молекулы ДНК макронуклеуса, отходящие от "организующих центров" хроматиновых телец [44]. С учетом того, что размер петель ДНК в хроматине высших эукариот составляет ~ 100 т.п.н. [4], в каждом хроматиновом тельце одна молекула ДНК образует 1–10 петель.

На рис. 7 представлены два варианта образования таких петель. В первом случае (рис. 7а) основания петель закреплены в центральной части хроматинового тельца наподобие концевых теломерных фрагментов минихромосом. Такая модель аналогична модели организации хромомеров в ядрах эукариот, предложенной Cook [11], с той разницей, что в модели Cook петли закреплены в центральной части хромомеров с помощью РНКполимераз и белков – факторов транскрипции, входящих в состав так называемых транскрипционных фабрик, а в хроматиновых тельцах инфузорий теломерные концы молекул ДНК связаны с TeBP. Однако в настоящее время нет подтвержденных данных о содержании в центральной части молекул ДНК макронуклеусов последовательностей, гомологичных теломерным концефрагментам. Кроме того, при вым такой организации затруднена транскрипция генов, расположенных в центральной части телец. Можно предположить (рис. 76), что петли в хроматиновых тельцах образуются за счет динамических взаимодействий различных участков нуклеосомной фибриллы (как в ТАД-модели хроматина). С помощью компьютерного моделирования показано, что нуклеосомная фибрилла будет сворачиваться в компактную глобулу, если в результате модификации гистонов часть нуклеосом (в нетранскрибируемых участках) будет иметь большее сродство друг к другу, чем нуклеосомы в транскрибируемых участках [45]. При этом петли транскрибируемого хроматина располагались на поверхности смоделированной глобулы [45]. Кроме того, известно, что петли фибрилл хроматина могут стабилизироваться за счет взаимодействия энхансеров и промоторов при участии белка СТСГ и когезина [46]. Такая организация дает возможность динамического выпетливания части молекулы ДНК для транскрипции на поверхности ТАДа (рис. 76, звездочки). Именно такая картина наблюдается в макронуклеусах инфузорий при дифференцированном контрастировании нуклеиновых кислот: РНП выявляются в некоторых участках на поверхности хроматиновых телец (рис. 6в, г).



Рис. 7. Модели петельной организации хроматиновых телец. *а* – Петли фибрилл хроматина закреплены в центральной части телец. *б* – Петли хроматина образованы по принципу организации ТАДов. Звездочками отмечены участки транскрипционно-активного хроматина. Темные точки – квадруплексы теломерных концов минихромосом макронуклеуса в комплексе с белком TeBP.

ТАДы обнаружены не только в клетках высших эукариот, но и у дрозофилы, где они имеют вид дисков в политенных хромосомах [47]. Наши данные показывают, что по топологическим характеристикам хроматиновые тельца в макронуклеусах инфузорий с субхромосомным размером ДНК также соответствуют ТАДам высших эукариот. Как и ТАДы, хроматиновые тельца содержат по 90-1000 т.п.н. ДНК, организованы по петельному принципу, центральная часть телец содержит неактивный хроматин, а транскрипция происходит по периферии телец, как в случае транскрипции по периферии ТАДов или в интер-ТАДах высших эукариот [3]. Представленная на рис. 76 модель организации хроматина в соматических ядрах инфузорий позволяет легко объяснить укрупнение телец и образование фибрилл толщиной 200-300 нм при снижении активности макронуклеуса (рис. 6). Если ТеВР и другие белки, входящие в организующие центры хроматиновых телец, имеют большее сродство друг к другу, чем белки нуклеосомных фибрилл хроматина, то сначала агрегация организующих центров будет приводить к некоторому укрупнению телец, а затем, в силу стерических ограничений, дальнейшая агрегация организующих центров будет происходить только в продольном направлении, что приводит к формированию 200-300 нм фибрилл, аналогично модели образования хромонем из хромомеров [11]. Предложенная модель позволяет также предсказать, что в макронуклеусах видов с длинными молекулами ДНК должны преобладать структуры в виде одиночных хроматиновых телец, в то время как у видов с короткими минихромосомами чаще должны встречаться 200-300 нм

фибриллы хроматина. Проверить это предсказание планируется в ближайших исследованиях.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 01201363823).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Сгетет Т., Сгетет М., Сгетет С. (2018) 4D-нуклеом: компартментализация генома в контексте эволюции. *Биохимия*. **83**, 452–466.
- 2. Postberg J., Lipps H.J., Cremer T. (2010) Evolutionary origin of the cell nucleus and its functional architecture. *Essays Biochem.* **48**, 1–24.
- 3. Разин С.В., Ульянов С.В., Гаврилов А.А. (2019) 3D геномика. *Молекуляр. биология*. **53**, 911–923.
- Razin S.V. (1996) Functional architecture of chromosomal DNA domains. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 6, 247–269.
- 5. Cockerill P.N., Garrard W.T. (1986) Chromosomal loop anchorage sites appear to be evolutionarily conserved. *FEBS Lett.* **204**, 5–7.
- 6. Gasser S.M., Laemmli U.K. (1986) The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J.* **5**, 511–518.
- Iarovaia O., Hancock R., Lagarkova M., Miassod R., Razin S.V. (1996) Mapping of genomic DNA loop organization in a 500-kilobase region of the Drosophila X chromosome by the topoisomerase II-mediated DNA loop excision protocol. *Mol. Cell. Biol.* 16, 302–308.

- 8. Marsden M.P.F., Laemmli U.K. (1979) Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell.* **17**, 849–858.
- Belmont A.S., Sedat J.W., Agard D.A. (1987) A threedimensional approach to mitotic chromosome structure: evidence for a complex hierarchical organization. *J. Cell Biol.* 105, 77–92.
- 10. Zatsepina O.V., Polyakov V.Yu., Chentsov Yu.S. (1983) *Chromosoma*. **88**, 91–97.
- 11. Cook P.R. (1995) A chromomeric model for nuclear and chromosome structure. J. Cell Sci. 108, 2927–2935.
- Razin S.V., Iarovaia O.V., Vassetzky Y.S. (2014) A requiem to the nuclear matrix: from a controversial concept to 3D organization of the nucleus. *Chromosoma*. 123, 217–224.
- Nishino Y., Eltsov M., Joti Y., Ito K., Takata H., Takahashi Y., Hihara S., Frangakis A.S., Imamoto N., Ishikawa T., Maeshima K. (2012) Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 31, 1644–1653.
- Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J., Thor A., Ellisman M.H., O'Shea C.C. (2017) Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science*. 357(6349).
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragoczy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome . *Science*. **326**, 289–293.
- Kalhor R., Tjong H., Jayathilaka N., Alber F., Chen L. (2012) Genome architectures revealed by tethered chromosome conformation capture and populationbased modeling. *Nat. Biotechnol.* **30**, 90–98.
- Kantidze O.L., Razin S.V. (2020) Weak interactions in higher-order chromatin organization. *Nucl. Acids Res.* 48, 4614–4626.
- Разин С.В., Гаврилов А.А. (2018) Структурнофункциональные домены эукариотического генома. *Биохимия*. 83, 440–451.
- Jahn C.L., Klobutcher L.A. (2002) Genome remodeling in ciliated protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.* 56, 489– 520.
- 20. Raikov I.B. (1982) The protozoan nucleus. morphology and evolution. *Cell Biol. Monogr.* **9**, 1–474.
- Некрасова И.В., Потехин А.А. (2018) Интерференция РНК в формировании соматического генома у инфузорий *Paramecium* и *Tetrahymena*. Экологическая генетика. 16, 5–22.
- 22. Martinkina L.P., Vengerov Yu.Yu., Bespalova I.A., Tikhonenko A.S., Sergejeva G.I. (1983) The structure of inactive interphase macromolecular chromatin of the ciliate *Bursaria truncatella*. Radial loops in the structure of chromatin clumps. *Eur. J. Cell Biol.* **30**, 47–53.
- Борхсениус О.Н., Беляева Н.Н., Осипов Д.В. (1988) Структура хроматина соматического ядра инфузории Spirostomum ambiguum. Цитология. 30, 762-769.

- 24. Karajan B.P., Popenko V.I., Raikov I.B. (1995) Organization of transcriptionally inactive chromatin of interphase macronucleus of the ciliate *Didinium nasutum*. *Acta Protozool.* **34**, 135–141.
- 25. Леонова О.Г., Иванова Ю.Л., Караджан Б.П., Попенко В.И. (2004) Динамика ультраструктурных изменений хроматина и ядрышек макронуклеуса инфузорий *Paramecium caudatum и Bursaria truncatella* при гипотонической обработке. *Цитология*. 46, 456–464.
- Sonneborn T.M. (1970) Methods in *Paramecium* research. *Methods Cell Physiol.* 4, 241–339.
- Rautian M.S., Potekhin A.A. (2002) Electrokaryotypes of macronuclei of several *Paramecium* species. J. Eukaryot. Microbiol. 49, 296–304.
- Nekrasova I.V., Przybos E., Rautian M.S., Potekhin A.A. (2010) Electrophoretic karyotype polymorphism of sibling species of the *Paramecium aurelia* complex. *J. Eukaryot. Microbiol.* 57, 494–507.
- Тимофеева А.С., Раутиан М.С. (1997) Определение размера генома внутриядерной симбиотической бактерии *Holospora undulata* методом пульс-электрофореза. *Цитология*. **39**, 634–639.
- Kornberg R.D. (1977) Structure of chromatin. Ann. Rev. Biochem. 46, 931–954.
- Olins A.L., Olins D.E. (1974) Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*. 183, 330–332.
- Tikhonenko A.S., Bespalova I.A., Martinkina L.P., Popenko V.I., Sergejeva G.I. (1984) Structural organization of macronuclear chromatin of the ciliate *Bursaria truncatella* in resting cysts and at excysting. *Eur. J. Cell. Biol.* 33, 37–42.
- 33. Sloane N.J.A. (1984) The packing of spheres. *Sci. American.* **25**, 116–124.
- 34. Duret L., Cohen J., Jubin C., Dessen F., Goüt J.-F., Mousset S., Aury J.-M., Jaillon O., Noël B., Arnaiz O., Bétermier M., Wincker P., Meyer E., Sperling L. (2008) Analysis of sequence variability in the macronuclear DNA of *Paramecium tetraurelia*: a somatic view of the germline. *Genome Res.* 18, 585–596.
- Pritchard A.E., Seilhamer J.J., Mahalingam R., Sable C.L., Venuti S.E., Cummings D.J. (1990) Nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *Paramecium*. *Nucl. Acids Res.* 18, 173–180.
- Johri P., Marinov G.K., Doak T.G., Lynch M. (2019) Population genetics of *Paramecium* mitochondrial genomes: recombination, mutation spectrum, and efficacy of selection. *Genome Biol. Evol.* 11, 1398–1416.
- Arnaiz O., Meyer E., Sperling L. (2020) Paramecium DB 2019: integrating genomic data across the genus for functional and evolutionary biology. *Nucl. Acids Res.* 48, D599–D605.
- Bernhard W. (1969) A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultrastruct. Res. 27, 250–265.
- 39. Richmond T.J., Davey C.A. (2003) The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*. **423**, 145–150.
- 40. Murti K.G., Prescott D.M. (1999) Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 14436–14439.

- Murti K.G., Prescott D.M. (2002) Topological organization of DNA molecules in the macronucleus of hypotrichous ciliated protozoa. *Chromosome Res.* 10, 165–173.
- Jönsson F., Postberg J., Schaffitzel C., Lipps H.J. (2002) Organization of the macronuclear gene-sized pieces of stichotrichous ciliates into a higher order structure via telomere-matrix interactions. *Chromosome Res.* 10, 445–453.
- Schaffitzel C., Postberg J., Paeschke K., Lipps H.J. (2010) Probing telomeric G-quadruplex DNA structures in cells with *in vitro* generated single-chain antibody fragments. *Meth. Mol. Biol.* 608, 159–181.
- 44. Новикова Е.Г., Попенко В.И. (1998) Визуализация организующих центров хроматина макронуклеуса

инфузории Bursaria truncatella. Молекуляр. биология. **37**, 567–575.

- 45. Gavrilov A.A., Shevelyov Y.Y., Ulianov S.V., Khrameeve E.E., Kos P., Chertovich A., Razin S.V. (2016) Unraveling the mechanisms of chromatin fibril packaging. *Nucleus.* 7, 319–324.
- 46. Rao S.S., Huntley M.H., Durand N.C., Stamenova E.K., Bochkov I.D., Robinson J.T., Sanborn A.L., Machol I., Omer A.D., Lander E.S., Aiden E.L. (2014) A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell.* **159**, 1665–1680.
- Колесникова Т.Д. (2018) Дисковый рисунок политенных хромосом как отражение универсальных принципов организации хроматина в топологические домены. *Биохимия*. 83, 480–492.

PACKAGING OF SUBCHROMOSOMAL SIZE DNA MOLECULES IN CHROMATIN BODIES IN THE MACRONUCLEI OF CILIATES

O. G. Leonova¹, A. A. Potekhin^{2, 3}, I. V. Nekrasova², B. P. Karajan⁴, B. V. Syomin⁵, V. S. Prassolov¹, and V. I. Popenko^{1, *}

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

² Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

³ Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 199034 Russia

⁴ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 194064 Russia

⁵ Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119435 Russia

*e-mail: popenko@eimb.ru

A fundamental difference between the somatic nuclei (macronuclei) of ciliates and the cell nuclei of higher eukaryotes is that the macronuclear genome is represented by a huge number (up to tens and hundreds of thousands) of "gene-sized" (0.5–25 kb) or "subchromosomal" (up to 2000 kb) minichromosomes. Electron microscopy data show that at the interphase stage, macronuclear chromatin usually looks like chromatin bodies or fibrils 200-300 nm thick. However, the question of how many DNA molecules are contained in an individual chromatin body remains open. In this work, we studied the ciliate *Didinium nasutum* and three species of *Paramecium sp.* The aim of the work was to clarify the organization of chromatin in macronuclei of ciliates differing in pulse-electrophoretic karyotype, and to what extent it corresponds to the model of topologically associated domains in the nuclei of higher eukaryotes. It was shown by the method of pulsed electrophoresis that the sizes macronuclear DNAs of the studied species are in the range of 50-1700 kb, but the majority of the molecules are less than 500 kb in length. A comparative quantitative analysis of pulse electrophoresis and electron microscopy data showed that at the stage of logarithmic growth of the culture, each chromatin body of P. multimicronucleatum contains one minichromosome, while the bodies in the macronucleus of D. nasutum contain two or more DNA molecules. However, during starvation when the activity of macronuclei decreased, chromatin bodies aggregated, which led to an increase in their size and/or the formation of 200-300 nm fibrils consisting of several chromatin bodies. A model for the formation of such structures is proposed. The data obtained show that, in terms of topological characteristics, chromatin bodies in the macronuclei with subchromosomal DNA molecules correspond to topologically associated domains of higher eukaryotes.

Keywords: chromatin, ciliates, macronucleus, pulse electrophoresis, electron microscopy, topologically associated domains

1010

—— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 577.27

СЫВОРОТКИ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗОЙ МТ1-ММР, СНИЖАЮТ МИГРАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2021 г. Н. А. Митькин^{*a*, *}, А. С. Устюгова^{*a*}, А. Н. Уварова^{*a*}, К. А. Румянцев^{*b*}, К. В. Корнеев^{*a*}, В. В. Павшинцев^{*c*}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия ^bМосковский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, 111123 Россия

> ^сООО "НИИ Митоинженерии МГУ", Москва, 119192 Россия *e-mail: mitkin.n.a@gmail.com Поступила в редакцию 18.03.2021 г. После доработки 05.05.2021 г. Принята к публикации 13.05.2021 г.

Экспрессия матриксных металлопротеиназ, в частности МТ1-ММР, повышена в клетках рака поджелудочной железы (РПЖ), что ассоциировано с усилением способности опухоли к пролиферации, инвазии и миграции. MT1-MMP в настоящий момент рассматривается в качестве перспективной мишени для медикаментозной терапии РПЖ. Однако использование ингибиторов и терапевтических антител к МТ1-ММР ограничено узкими временными рамками: эффективность их действия достигает максимума только на ранней бессимптомной стадии заболевания. Эта проблема может быть решена методом активной иммунизации собственными ММР на стадии обнаружения первичной опухоли. В этом случае терапевтический эффект могут оказывать ММР-специфичные антитела, продукция которых возобновляется при появлении рецидивов. В результате проведенного исследования подобран оптимальный режим активной иммунизации фрагментами MT1-MMP, позволяющий получать высокий титр специфичных антител, блокирующих ферментативную активность этой MMP в сыворотке крови мышей линии C57BL/6. Полученные антисыворотки снижают миграцию клеток PANC-02 (РПЖ мышей) через коллагеновый матрикс, а также ингибируют активацию основных индукторов эпителиально-мезенхимального перехода: TGF-β и MMP-2. В перспективе результаты, полученные в ходе исследования, могут быть использованы при разработке препаратов для иммунотерапии РПЖ, а предлагаемый подход – для дизайна противоопухолевых препаратов пролонгированного действия.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, MT1-MMP, пептиды, иммунизация, антисыворотки, рак поджелудочной железы, TGF-β, эпителиально-мезенхимальный переход, мыши, PANC-02 DOI: 10.31857/S0026898421060094

Рак поджелудочной железы (РПЖ) относится к агрессивным злокачественным новообразованиям: средние время жизни пациентов после постановки диагноза составляет 4-6 месяцев, а 5-летняя выживаемость только 5-7% [1]. Во многом это связано с тем, что ранние стадии заболевания протекают бессимптомно, что затрудняет своевременную диагностику РПЖ – только у 20% пациентов с впервые диагностированным РПЖ опухоль подлежит хирургическому лечению [2] - наиболее действенному способу терапии, так как эффективность радио- и химиотерапии в отношении этого типа рака остается крайне низкой. Так, выживаемость пациентов, прошедших курс химиотерапии препаратом нового поколения гемцитабином, одобренным для лечения прогрессирующего

РПЖ [3], составляет в среднем 6 месяцев [1]. Следует сказать, что у 85% успешно прооперированных пациентов в течение 3 лет развиваются рецидивы, что снижает выживаемость больных РПЖ [4]. При проведении адъювантной химиотерапии (с использованием агента S-1 или гемцитабина) доля пациентов, у которых наблюдаются рецидивы опухоли, снижается, но все равно остается крайне высокой – около 70% в 3-летней перспективе [5, 6]. И тут важнейшая задача – диагностика локальных рецидивов, когда еще возможно их удаление. К сожалению, методы томографии, которые используют в этом случае, далеко не всегда позволяют детектировать опухоль, возникшую в ранее прооперированной ткани [2].

Таким образом, в настоящий момент большое внимание уделяется поиску терапевтических подходов, позволяющих замедлить рост рецидивной опухоли и локализовать ее, тем самым сохраняя ее на момент обнаружения в состоянии, поддающемся хирургическому лечению. Например, в качестве перспективных мишеней рассматриваются матриксные металлопротеиназы (ММР) [7]. Известно. что экспрессия ряда металлопротеиназ (MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MT1-MMP, МТ2-ММР, МТ3-ММР) повышена в клетках РПЖ [8], а в крови больных РПЖ детектируют MMP-2, MMP-7 и MMP-9, которые предлагают использовать в качестве диагностических маркеров [9]. Основной эффект ММР в прогрессии опухоли обусловловлен протеолизом коллагена – ключевого компонента внеклеточного матрикса, - что способствует опухолевой инвазии и ангиогенезу [10]. Протеолитическая активность ряда ММР задействована в регуляции активности факторов, индуцирующих онкогенез. Так, ММР-2 и MT1-MMP активируют TGF-β, который, в свою очередь, индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [11, 12]. Показано, что МТ1-ММР участвует в процессинге TGF-β-связывающего белка 1 (LTBP-1), тем самым индуцируя высвобождение латентного TGF-β и последующую активацию белков семейства Snail, усиливающих инвазию и миграцию раковых клеток [13]. Именно селективное ингибирование МТ1-ММР, но не ММР-2, ассоциировано с подавлением активности Snail [13]. Еще одна мишень MT1-MMP — микроРНК let-7, которая отвечает за деградацию мРНК HMGA2 (High Mobility Group AT-hook 2) – белка, вовлеченного в организацию структуры хроматина и контроль экспрессии генов. Повышение экспрессии HMGA2, сопровождающееся усиленным фосфорилированием ERK1/2, ассоциировано с устойчивостью раковых клеток к гемцитабину, в то время как ингибиторы МТ1-ММР снижают развитие резистентности [14]. Кроме того, под действием МТ1-ММР идет протеолиз и активация ММР-2 [15]. На основании вышеизложенного логично предположить, что МТ1-ММР стоит рассматривать в качестве перспективной терапевтической мишени для лечения РПЖ [16].

В клинических испытаниях ММР-ингибиторов широкого спектра, таких как маримастат и таномастат, как препаратов для лечения РПЖ, выявлена их эффективность, хотя она была значительно ниже, чем для селективных ингибиторов (в частности специфичных антител DX-2400 и LEM-2/15) [8]. В настоящий момент известно, что низкая эффективность ММР-ингибиторов широкого спектра, прежде всего, связана с ингибированием ММР-9. Это нежелательная мишень при терапии РПЖ, так как отсутствие ММР-9 ассоциировано с повышенным уровнем интерлейкина-6 (IL-6) и усилением инвазивного и метастатического потенциала клеток опухоли в результате активации сигнального каскада STAT-3 [17]. Следует сказать, что многообещающие результаты по снижению способности клеток РПЖ к миграции получены для MT1-MPP-селективных ингибиторов (IS4, THCP8 и т.д.) и специфичных антител (DX-2400, LEM-2/15 и т.д.) [8]. Важно отметить, что любые ингибиторы ММР эффективны как противоопухолевые агенты только в узком временном интервале - до того момента, когда произошло разрастание первичной опухоли [18]. Это затрудняет использование низкомолекулярных ингибиторов и антител к ММР при терапии и предупреждении локальных рецидивов. Именно с этим связывают тот факт, что в клинических испытаниях ММР-ингибиторов и -антител до сих пор не получено желаемых результатов - на прогрессирующей стадии онкологического заболевания они малоэффективны, хотя перспективы их использования на ранних стадиях исследуют [19]. Так, по результатам доклинических испытаний, ингибиторы ММР эффективно подавляют рост злокачественных опухолей на ранних стадиях заболевания [20], а их применение перед хирургическим вмешательством позволяет снизить вероятность возникновения как локальных рецидивов, так и метастазов [21].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Лабораторные животные. В исследовании использованы самцы мышей линии C57BL/6 категории SPF в возрасте 8 недель. Животные были получены из SPF-вивария лабораторных животных Института цитологии и генетики CO PAH (Новосибирск, Россия). Мышей содержали в стандартных условиях: температура $20-24^{\circ}C$ (дневная разница температуры не более $2^{\circ}C$), относительная влажность воздуха 30-70%, световой цикл 12/12 с началом дневной фазы в 9:00 по местному времени, стандартная диета. Все манипуляции с животными проводили между 14:00 и 18:00 по местному времени.

Экспериментальные группы и иммунизация мышей C57BL/6 фрагментами белка МТ1-ММР. Описание антигенов, а также названия экспериментальных групп животных (n = 10 для каждой группы) представлены ниже:

— imMT1: пептид AEPWTVRNEDLNGND, V-В петля каталитического домена, использованная для получения антител LEM-2/15, ингибирующих активность MT1-MMP человека и мыши и не обладающих кросс-реактивностью к другим MMP [22];

 - imMT2: пептид NEITFCIQNY, фрагмент МТ-петли, используемый для получения антител, блокирующих ферментативную активность MT1-MMP [23]; - imMT3: плазмидный вектор pcDNA 3.1, содержащий кодирующую последовательность полного каталитического домена MT1-MMP;

 - imMT4: плазмидный вектор pcDNA 3.1, содержащий кодирующую последовательность пептида AEPWTVRNEDLNGND;

 - imMT5: плазмидный вектор pcDNA 3.1, содержащий кодирующую последовательность пептида NEITFCIQNY;

 - imMT6: плазмидный вектор pcDNA 3.1, содержащий кодирующую последовательность фрагмента каталитического домена MT1-MMP, часто используемого в качестве антигена для продукции антител (аминокислотные остатки 145–174);

 – пептидный контроль: инъекция белка KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin, гемоцианин лимфы улитки) совместно с адъювантом;

 плазмидный контроль: инъекция "пустой" плазмиды pcDNA 3.1.

Пептидные фрагменты (группы imMT1 и imMT2), синтезированные на контрактной основе ("Life Tein", США), конъюгировали со стандартным белком-носителем КLH ("Sigma-Aldrich", США). Иммунизацию животных в группах imMT1 и imMT2 проводили на 1, 10 и 21 сутки эксперимента, вводя подкожно препарат, одна доза которого содержала 100 мкг исследуемого конъюгата или контрольной субстанции и 100 мкл 2%-ного гидроксида алюминия AlumVax ("OZ BIOSCIENCES", Франция) в качестве адъюванта.

Сборку плазмид для вакцинации (группы im-MT3, imMT4, imMT5, imMT6) проводили на базе вектора pcDNA 3.1 ("Promega", США), широко используемого для конструирования противоопухолевых ДНК-вакцинах [24]. Проводили амплификацию необходимых кодирующих последовательностей, используя в качестве матрицы коммерчески доступную полноразмерную последовательность, кодирующую MT1-MMP (MG51026-UT, "Sino Biological", США), и праймеры, содержащие сайты рестрикции NheI для прямых праймеров и HindIII для обратных (табл. 1). Смесь для ПЦР-амплификации включала 100 нг ДНК-матрицы, 200 мМ каждого dNTP, однократный буфер Phusion HF (F-530L; "Thermo Fisher Scientific", США), 15 пкмоль каждого праймера, 0.5 ед. активности ДНК-полимеразы Phusion (F-530L; "Thermo Fisher Scientific"). Общий объем смеси составлял 20 мкл. Амплификацию проводили в течение 35 циклов с использованием следующих условий: денатурация ДНК при 98°С в течение 10 с, отжиг праймеров при 6°С в течение 20 с, элонгация цепи ДНК при 72°С в течение 15 с. Полученные ампликоны клонировали в плазмиду pcDNA 3.1 по сайтам рестрикции NheI и HindIII, для чего пролукты амплификации и плазмилы обрабатывали рестриктазами NheI и HindIII ("Thermo Fisher Scientific") при 37°С в течение 2 ч в рекомендуемом производителем буфере Tango, после чего ампликоны и плазмиды лигировали с использованием ДНК-лигазы T4 ("Thermo Fisher Scientific"). Coбранные плазмиды очищали, верифицировали и накапливали в препаративных количествах с использованием набора Plasmid Midiprep kit ("Invitrogen", США) по методикам, опубликованным ранее [25, 26]. Все полученные плазмиды вводили мышам линии C57BL/6 по следующей схеме: трехкратная внутримышечная инъекция раствора, содержащего 100 мкг плазмиды (на 1, 10 и 21 сутки эксперимента).

Забор образцов крови. Забор образцов крови проводили у всех иммунизированных животных на 21 сутки эксперимента из лицевой вены методом открытой капли (в объеме 30 мкл), а на 30 сутки — из камер сердца (в объеме 600 мкл), после чего проводили эвтаназию животных. Все процедуры проводили под изофлурановым наркозом.

Определение титра антител к МТ1-ММР в сыворотке крови иммунизированных животных. Титры антител в сыворотке крови оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) с ис-

Таблица 1. Последовательности праймеров для амплификации фрагментов ДНК, кодирующих пептидные фрагменты МТ1-ММР

Праймер ^а	Последовательность, $5' \rightarrow 3'$
imMT3 fw	ATAGCTAGCTACGCCATCCAGGGTCTCAA
imMT3 rev	ATAAAGCTTCCCTGACTCACCCCCATAAA
imMT4 fw	ATAGCTAGCGCCGAGCCTTGGACTGTC
imMT4 rev	ATCAAGCTTGTCATTTCCATTCAGATCCT
imMT5 fw	ATAGCTAGCAACGAAATTACCTTTTGCAT
imMT5 rev	ATCAAGCTTATAGTTCTGAATGCAAAAGG
imMT6 fw	ATAGCTAGCGCGTTTCGCGTGTGGGAAAG
imMT6 rev	ATCAAGCTTTATATTCGCGAAGGCCATGAA

^а Обозначения: fw – прямой праймер; rev – обратный праймер.

пользованием конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) антител кролика против IgG мыши ("ИМТЕК", Россия) и тетраметилбензидина (ТМВ) в качестве субстрата HRP (ЗАО "Иммунотех", Россия). Интенсивность окраски измеряли на планшетном спектрофотометре при длине волны 450 нм, как описано ранее [27]. Для определения титров антител, выработанных на разные антигены, использовали 96-луночные планшеты, сенсибилизированные следующими препаратами:

 – рекомбинантным белком МТ1-ММР мыши ("Creative Biomart", США);

– рекомбинантным белком МТ1-ММР человека ("R&D Systems", США), предназначенным для контроля перекрестной специфичности мышиных антисывороток с белком человека;

– рекомбинантным белком ММР-9 мыши ("Novus Biologicals", США), предназначенным для контроля перекрестной специфичности мышиных антисывороток к "нежелательной" мишени;

 – бычьим сывороточным альбумином (BSA) для контроля неспецифичного связывания антител.

Определение ферментативной активности мышиных МТ1-ММР и ММР-9. Анализ выполняли с использованием рекомбинантных мышиных белков МТ1-ММР ("Creative Biomart") и ММР-9 ("Novus Biologicals"), обладающих ферментативной активностью, и набора для определения активности металлопротеиназ ММР Activity Assay kit (ab112146; "Abcam", Великобритания) с фирменным пептидным субстратом ММР Green. В опытные образцы добавляли антисыворотки, собранные на 30 сутки эксперимента, для оценки их влияния на активность исследуемых металлопротеиназ. В качестве контроля использовали неселективный ингибитор металлопротеиназ СР-101537 ("Sigma-Aldrich"). Анализ проводили по протоколам производителя.

Линии клеток. Клетки линии РПЖ мыши PANC-02 приобретены в официальном репозитории (ATCC, США). Клетки культивировали в среде DMEM ("Life Technologies", США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; "Thermo Fisher Scientific").

Анализ антисывороток как ингибиторов миграционной активности клеток PANC-02. Миграционную активность клеток определяли на культуральных планшетах с 8-микрометровыми вставками Transwell ("Corning", США), предварительно обработанными коллагеном 1 типа ("BD Biosciences", США). Скорость миграции клеток PANC-02 через коллагеновый матрикс в присутствии/ отсутствие исследуемых сывороток анализировали в течение 40 ч. В качестве положительного контроля использовали антитела LEM-2/15 ("Creative Biolabs", США), специфически ингибирующие ферментативную активность MT1-MMP [22]. Подсчет мигрировавших клеток осуществляли с использованием колориметрического МТТ-теста по методике, описанной ранее [28].

Определение ферментативной активности MMP-2. Клетки PANC-02 инкубировали с MT1-MMPспецифичными антисыворотками, которые добавляли непосредственно в кондиционную среду. В качестве положительного контроля использовали антитела LEM-2/15. Ферментативную активности MMP-2 в кондиционной среде определяли по отношению к фирменному пептидному субстрату CS-61 с использованием набора MMP-2 Biotrak Activity Assay ("GE Healthcare", США) по протоколу производителя.

Определение содержания активной формы TGF-β в кондиционной среде. Клетки PANC-02 инкубировали с MT1-MMP-специфичными антисыворотками, которые вносили в кондиционную среду. В качестве положительного контроля использовали антитела LEM-2/15. Измерение уровней активной формы TGF-β1 в кондиционной среде проводили методом ИФА с использованием набора LEGEND MAX[™] Free Active TGF-β1 ELISA kit ("Biolegend", США) по протоколу производителя. Использованный метод позволяет определить содержание активного (свободной формы) TGF-β1, не детектируя при этом латентную форму TGF-β1 – в виде комплекса с латентно ассоциированным пептидом (LAP).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунизация мышей линии C57BL/6 пептидными фрагментами MT1-MMP индуцирует высокие титры антител, специфичных к MT1-MMP человека и мыши

Мышей линии C57BL/6 иммунизировали пептидными фрагментами металлопротеиназы MT1-ММР с целью получения антисывороток, удовлетворяющих следующим критериям: высокий титр анти-МТ1-ММР-антител; ингибирование ферментативной активности MT1-MMP; отсутствие кросс-специфичности к ММР-9 как "нежелательной" мишени при терапии РПЖ. Последнее требование связано с тем, что, как упоминалось выше, в отсутствие ММР-9 активируется сигнальный каскад STAT-3, вовлеченный в канцерогенез опухоли [17]. Именно этот фактор ограничивает использование полноразмерного белка МТ1-ММР в качестве антигена, так как индуцируемые им поликлональные антитела могут быть специфичны и к ММР-9. Для выбора оптимальных условий иммунизации мы проанализировали два основных типа антигенов: пептидные фрагменты МТ1-ММР и плазмидные ДНК-вакцины, кодирующие эти пептидные фрагменты (см. раздел "Экспериментальные группы и иммунизация мышей C57BL/6 фрагментами белка МТ1-ММР").



Рис. 1. Титры антител к MT1-MMP мыши и человека, а также к MMP-9 мыши в сыворотках крови мышей на 0, 22 и 30 сутки после завершения иммунизации образцами imMT1–imMT6. Сыворотки анализировали методом ИФА, в качестве антигенов использованы соответствующие белки: MT1-MMP мыши, MT1-MMP человека, MMP-9 мыши, а также BSA (в качестве отрицательного контроля), – адсорбированные на поверхности 96-луночного планшета. n = 10 для каждой группы. *P < 0.01 относительно группы "пептидный контроль" для групп imMT1 и imMT2; относительно группы "плазмидный контроль" для групп imMT3, imMT4, imMT5 и imMT6.

Иммуногенность исследованных образцов оценивали методом ИФА – по титрам МТ1-ММР-специфичных антител в сыворотках крови животных (рис. 1).

Из представленных результатов видно, что наиболее высокие титры антител наблюдаются на 30 сутки при иммунизации агентами imMT1, imMT3, imMT4 и imMT6. Следует заметить, что при использовании пептидных антигенов (imMT1 и imMT2) уровень антител к MT1-MMP мыши и человека повышается на 22 сутки и остается практически таким же на 30 сутки. В случае ДНК-конструкций (imMT3, imMT4, imMT5 и imMT6) титр антител на 30 сутки гораздо выше, чем через 22 суток. Более длительное время формирования специфического ответа при использовании ДНК-варианта иммуногенов может быть обусловлено многостадийностью процессов иммуногенеза: для выработки антител необходимо проникновение плазмиды в мышечные клетки и затем наработка в них антигена в достаточном количестве [29].

Следует отметить, что для всех антител выявлена перекрестная специфичность к MT1-MMP мыши и человека, а сыворотки imMT3 и imMT6 связывались и с MMP-9 – "нежелательным" антигеном. Широкая кросс-реактивность imMT3 и imMT6 может быть связана с тем, что в качестве иммуногена использованы крупные фрагменты белка MT1-MMP, а это повышает вероятность



Рис. 2. Влияние исследуемых сывороток на ферментативную активность мышиных МТ1-ММР и ММР-9 *in vitro*. Анализ ферментативной активности выполняли с использованием активных форм рекомбинантных мышиных белков МТ1-ММР (*a*) и ММР-9 (*b*) и набора Activity Assay kit (ab112146; "Abcam") для определения активности металлопротеиназ на пептидном субстрате ММР Green. n = 10 для каждой точки. *P < 0.01, "P < 0.05 (относительно отрицательного контроля). Обозначения: К – отрицательный контроль (без ингибиторов); Пептид – пептидный контроль; Плазмина – плазмидный контроль; СР-101537 – ингибитор металлопротеиназ.



Рис. 3. Влияние сывороток imMT1 и imMT4 на миграционную активность клеток PANC-02. Результаты представлены как процент клеток, мигрировавших через вставку Transwell в течение 40 ч, от общего числа нанесенных клеток (принято за 100%). n = 10 для каждой точки. *P < 0.01 относительно отрицательного контроля. Обозначения см. в подписи к рис. 2.

присутствия в них эпитопов других металлопротеиназ.

Полученные антисыворотки ингибируют ферментативную активность MT1-MMP

На следующем этапе мы оценили способность всех полученных антисывороток ингибировать гидролитическую активность мышиных MT1-MMP (рис. 2a) и MMP-9 (рис. 2δ) по отношению к пептидному субстрату MMP Green.

Из результатов, представленных на рис. 2, видно, что все полученные антисыворотки ингибируют гидролитическую активность MT1-MMP по отношению к пептидному субстрату MMP Green, хотя для imMT2 и imMT5 этот эффект выражен слабее, что коррелирует с низким содержанием антител в этих сыворотках (рис. 1). Показано, что сыворотки imMT3 и imMT6 не только связываются с MMP-9, но и ингибируют активность этой металлопротеиназы, то есть дают нежелательный эффект. На основании полученных результатов дальнейшие исследования мы проводили на сыворотках imMT1 и imMT4, полученных на фрагмент AEPWTVRNEDLNGND белка MT1-MMP.

MT1-MMP-специфичные антисыворотки ингибируют миграцию клеток PANC-02

С целью оценить потенциал выбранных нами сывороток, imMT1 и imMT4, как ингибиторов инвазии и метастазировния раковых клеток мы проанализировали их способность подавлять миграцию клеток линии PANC-02 РПЖ мыши, для которых характерна повышенная продукция металлопротеиназ MT1-MMP, MMP-9 и MMP-2 [30]. Результаты анализа скорости миграции клеток PANC-02 через коллагеновый матрикс в течение 40 ч в присутствии антисывороток imMT1 и imMT4 или контрольных антител LEM-2/15, специфично ингибирующих активность MT1-MMP [22], представлены на рис. 3.

Из представленных результатов видно, что обе антисыворотки: imMT1 и imMT4 — замедляют миграцию клеток PANC-02, причем по величине этот эффект сопоставим с антителами LEM-2/15. Таким образом, в системе *in vitro* получены обнадеживающие результаты относительно действия сывороток imMT1 и imMT4 на миграционную активность раковых клеток. Ответ на вопрос, ингибируют ли они инвазивную активность и метастазирование раковых клеток, предстоит дать в дальнейших исследованиях — уже в системах *in vivo*.

MT1-MMP-специфичные антисыворотки значимо снижают ферментативную активность MMP-2 и содержание активной формы TGF-β в кондиционной среде

Нами проанализировано действие сывороток imMT1 и imMT4 на регуляторные процессы, которые могут играть значимую роль в прогрессии РПЖ. В частности известно, что субстратами протеолитического действия МТ1-ММР служат такие белки, как MMP-2 [15] и TGF-β [11]. При прогрессии опухоли активация TGF-β индуцирует ЭМП [11], при этом активированная МТ1-ММР-протеолизом металлопротеиназа ММР-2, как и МТ1-ММР, тоже напрямую активирует TGF-β [15]. С целью исследовать действие анти-MT1-MMP-сывороток imMT1 и imMT4 как ингибиторов активации TGF-В мы проанализировали ферментативную активность МТ1-ММР в кондиционной среде клеток PANC-02 с этими и контрольными мышиными сыворотками. В этом эксперименте оценивали ферментативную активность ММР-2 и содержание активной формы TGF-β в кондиционной среде (рис. 4).

Обе антисыворотки значимо снижали как активность MMP-2 (рис. 4a), так и содержание активной формы TGF- β (рис. 4δ) в кондиционной среде, причем эффективность их действия сопоставима с антителами LEM-2/15. Таким образом, подтверждено действие анти-MT1-MMP-сывороток imMT1 и imMT4 как ингибиторов активации TGF- β – фактора, играющего ключевую роль в прогрессии РПЖ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного исследования подобран режим иммунизации мышей пептидными фрагментами МТ1-ММР, позволяющий получать высокий титр специфичных антител в сыворотке. Эти антитела могут замедлять процессы, играющие ключевую роль в прогрессии и метастазировании РПЖ. Иммуногенность плазмиды, кодирующей фрагмент AEPWTVRNEDLNGND белка MT1-MMP (imMT4), сравнима с таковой для индивидуального пептида (imMT1), что важно в перспективе при разработке лекарственного препарата. Преимущество ДНК-вакцин состоит в том, что эта технология позволяет ввести в состав плазмиды последовательность, кодирующую полноразмерный белок-иммуноген или его фрагмент, а их корректный фолдинг обеспечивает клеточный аппарат хозяина [31]. Кроме того, ДНК-вакцины характеризуются высокой стабильностью, а бактериальные последовательности ДНК (с неметилированными СрG-участками), присутствующие в векторе, играют роль адъюванта, активируя рецептор врожденного иммунитета TLR9 [31]. В настоящий момент ряд противоопухолевых препара-



Рис. 4. Влияние сывороток imMT1 и imMT4 на ферментативную активность MMP-2 (*a*) и содержание активной формы TGF- β (*б*) в кондиционной среде клеток PANC-02. **P* < 0.01, #*P* < 0.05 (относительно отрицательного контроля). Обозначения см. в подписи к рис. 2.

тов, полученных на ДНК-платформе, находится на стадии клинических испытаний: вакцинация антигенами РАР и PSMA при раке простаты, HER2 и Mam-A при раке молочной железы, CEA при колоректальном раке [29], фрагментами белка р62 при некоторых со́лидных опухолях [32].

В целом, иммунизация фрагментом белка MT1-MMP на стадии обнаружения первичной опухоли представляется хорошей альтернативой использованию ингибиторов. Эта стратегия направлена на подавление активности MT1-MMP в первичной опухоли и индукцию гуморального иммунного ответа (продукцию MT1-MMP-специфичных антител) в случае рецидива. Это позволит решить проблему узкого временного интервала, в рамках которого эффективно использование ингибиторов MT1-MMP.

Использование аутогенных белков-регуляторов в качестве антигенов с помощью предложенного метода иммунизации представляет большой интерес, так как позволяет в течение длительного времени изменять активность целевого белка при минимальном воздействии [33]. Так, в доклинических испытаниях выявлена эффективность и безопасность иммунизации эндогенным TNF как препарата, полавляющего развитие артрита [34, 35]. Недавно показано, что иммунизация крыс рекомбинантной алкогольдегидрогеназой (АДГ) индуцирует образование АДГ-специфичных антител, а их уровень коррелирует со снижением потребления алкоголя животными и нормализашией повеленческих параметров, причем без развития аутоиммунной патологии [36, 37]. В настоящий момент в разработке находится ряд препаратов для иммунотерапии онкологических заболеваний, в которых в качестве иммуногенов использованы фрагменты онкогенов или специфичных раковых антигенов, таких как CEA, MUC-1, SOX-2, OCT-4, IL-2 [38].

Таким образом, подходы активной иммунизации (как с использованием пептидов и белков в качестве антигенов, так и ДНК-плазмид, кодирующих эти антигены) в настоящий момент бурно развиваются и рассматриваются как альтернатива ингибиторам, особенно когда продолжительность действия становится одним из параметров, определяющих эффективность лекарственного препарата.

Необходимо сказать и о вызывающих озабоченность моментах при применении в качестве иммуногенов собственных антигенов организма это риск развития аутоиммунной патологии. Это основной аргумент критиков аутоиммунизации [39]. Однако в ряде работ постулируется, что подход можно считать достаточно безопасным при нешироком распространении антигена в организме в период ремиссии [32, 40]: мягкие режимы иммунизации приводят к запуску только В-клеточного ответа, а при отсутствии презентации антигена данный тип ответа переходит в неактивное состояние. В случае МТ1-ММР важно отметить низкую распространенность этой металлопротеиназы в организме [41] и крайне низкую доступность даже для малых молекул. В клинических испытаниях антиракового препарата ВТ1718, токсичного для клеток, продуцирующих МТ1-ММР, продемонстрирована его безопасность для здоровых людей [42]. Описанные факты позволяют предположить наличие в организме МТ1-ММР в количествах, достаточных для презентации и запуска нацеленного на него повторного В-клеточного ответа, только при наличии опухоли.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 19-74-00096).

При работе с животными соблюдены все международные, государственные и институциональные правила ухода и использования животных в научных исследованиях.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Seicean A., Petrusel L., Seicean R. (2015) New targeted therapies in pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 21, 6127–6145.
- Oberstein P.E., Olive K.P. (2013) Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? *Therap. Adv. Gastroenterol.* 6(4), 321–337.
- Oberstein P.E., Saif M.W. (2011) First-line treatment for advanced pancreatic cancer. *JOP. J. Pancreas.* 12, 96–100.
- Lee J., Ahn S., Cho I.K., Lee J., Kim J., Hwang J.-H. (2018) Management of recurrent pancreatic cancer after surgical resection: a protocol for systematic review, evidence mapping and meta-analysis. *BMJ Open.* 8, e017249.
- Xu J.-B., Jiang B., Chen Y., Qi F.-Z., Zhang J.-H., Yuan H. (2017) Optimal adjuvant chemotherapy for resected pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and network meta-analysis. *Oncotarget.* 8(46), 81419–81429.
- 6. Oettle H., Post S., Neuhaus P., Gellert K., Langrehr J., Ridwelski K., Schramm H., Fahlke J., Zuelke C., Burkart C. (2007) Adjuvant chemotherapy with gemcitabine *vs* observation in patients undergoing curativeintent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*. **297**(3), 267–277.
- 7. Fields G.B. (2015) New strategies for targeting matrix metalloproteinases. *Matrix Biol.* **44**, 239–246.
- 8. Knapinska A.M., Estrada C.-A., Fields G.B. (2017) The roles of matrix metalloproteinases in pancreatic cancer. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **148**, 339–354.
- Roy R., Yang J., Moses M.A. (2009) Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 27(31), 5287–5297.
- Vihinen P., Kähäri V. (2002) Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer* 99, 157–166.
- 11. Nguyen H.-L., Kadam P., Helkin A., Cao K., Wu S., Samara G.J., Zhang Q., Zucker S., Cao J. (2016) MT1-MMP activation of TGF- β signaling enables intercellular activation of an epithelial-mesenchymal transition program in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* **16**, 618– 630.
- Gialeli C., Theocharis A.D., Karamanos N.K. (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 278, 16–27.
- Shields M.A., Dangi-Garimella S., Krantz S.B., Bentrem D.J., Munshi H.G. (2011) Pancreatic cancer cells respond to type I collagen by inducing Snail expression to promote membrane type 1 matrix metalloproteinase-dependent collagen invasion. *J. Biol. Chem.* 286, 10495–10504.
- Dangi-Garimella S., Strouch M.J., Grippo P.J., Bentrem D.J., Munshi H.G. (2011) Collagen regulation of let-7 in pancreatic cancer involves TGF-β1-mediated membrane type 1-matrix metalloproteinase expression. *Oncogene.* **30**, 1002–1008.

- Ellenrieder V., Alber B., Lacher U., Hendler S.F., Menke A., Boeck W., Wagner M., Wilda M., Friess H., Büchler M. (2000) Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int. J. Cancer.* 85, 14–20.
- Pahwa S., Stawikowski M.J., Fields G.B. (2014) Monitoring and inhibiting MT1-MMP during cancer initiation and progression. *Cancers (Basel)*. 6, 416–435.
- Grünwald B., Vandooren J., Gerg M., Ahomaa K., Hunger A., Berchtold S., Akbareian S., Schaten S., Knolle P., Edwards D.R. (2016) Systemic ablation of MMP-9 triggers invasive growth and metastasis of pancreatic cancer *via* deregulation of *IL6* expression in the bone marrow. *Mol. Cancer Res.* 14, 1147–1158.
- 18. Bloomston M., Zervos E.E., Rosemurgy A.S. (2002) Matrix metalloproteinases and their role in pancreatic cancer: a review of preclinical studies and clinical trials. *Ann. Surg. Oncol.* **9**, 668–674.
- Winer A., Adams S., Mignatti P. (2018) Matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy: turning past failures into future successes. *Mol. Cancer Ther.* 17, 1147–1155.
- Cathcart J., Pulkoski-Gross A., Cao J. (2015) Targeting matrix metalloproteinases in cancer: bringing new life to old ideas. *Genes Dis.* 2, 26–34.
- Winer A., Janosky M., Harrison B., Zhong J., Moussai D., Siyah P., Schatz-Siemers N., Zeng J., Adams S., Mignatti P. (2016) Inhibition of breast cancer metastasis by presurgical treatment with an oral matrix metalloproteinase inhibitor: a preclinical proof-of-principle study. *Mol. Cancer Ther.* 15, 2370–2377.
- Udi Y., Grossman M., Solomonov I., Dym O., Rozenberg H., Moreno V., Cuniasse P., Dive V., Arroyo A.G., Sagi I. (2015) Inhibition mechanism of membrane metalloprotease by an exosite-swiveling conformational antibody. *Structure*. 23, 104–115.
- Shiryaev S.A., Remacle A.G., Golubkov V.S., Ingvarsen S., Porse A., Behrendt N., Cieplak P., Strongin A.Y. (2013) A monoclonal antibody interferes with TIMP-2 binding and incapacitates the MMP-2-activating function of multifunctional, pro-tumorigenic MMP-14/MT1–MMP. *Oncogenesis.* 2, e80–e80.
- Liu T.-T., Wu Y., Niu T. (2018) Human DKK1 and human HSP70 fusion DNA vaccine induces an effective anti-tumor efficacy in murine multiple myeloma. *Oncotarget.* 9(1), 178–191.
- Korneev K.V., Sviriaeva E.N., Mitkin N.A., Gorbacheva A.M., Uvarova A.N., Ustiugova A.S., Polanovsky O.L., Kulakovskiy I.V., Afanasyeva M.A., Schwartz A.M., Kuprash D.V. (2020) Minor C allele of the SNP rs7873784 associated with rheumatoid arthritis and type-2 diabetes mellitus binds PU.1 and enhances TLR4 expression. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866(3), 165626.
- 26. Митькин Н.А., Корнеев К.В., Горбачева А.М., Купраш Д.В. (2019) Сравнение эффективности связывания факторов транскрипции с аллельными вариантами регуляторных участков генов человека методами иммунопреципитации и ПЦР в реальном времени. Мол. биология. 53, 393–401.
- 27. Mitkin N.A., Muratova A.M., Sharonov G. V., Korneev K.V., Sviriaeva E.N., Mazurov D., Schwartz A.M.,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

Kuprash D.V. (2017) p63 and p73 repress CXCR5 chemokine receptor gene expression in p53-deficient MCF-7 breast cancer cells during genotoxic stress. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **1860**, 1169–1178.

- Mitkin N.A., Hook C.D., Schwartz A.M., Biswas S., Kochetkov D.V., Muratova A.M., Afanasyeva M.A., Kravchenko J.E., Bhattacharyya A., Kuprash D.V. (2015) P53-dependent expression of CXCR5 chemokine receptor in MCF-7 breast cancer cells. *Sci. Rep.* 5, 1–9.
- Yang B., Jeang J., Yang A., Wu T.C., Hung C.-F. (2014) DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10, 3153–3164.
- Slapak E.J., Duitman J., Tekin C., Bijlsma M.F., Spek C.A. (2020) Matrix metalloproteases in pancreatic ductal adenocarcinoma: key drivers of disease progression? *Biology (Basel)*. 9(4), 80.
- Senovilla L., Vacchelli E., Garcia P., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. (2013) Trial watch: DNA vaccines for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2(4), e23803.
- 32. Ponomarenko D.M., Klimova I.D., Chapygina Y.A., Dvornichenko V.V., Zhukova N.V., Orlova R.V., Manikhas G.M., Zyryanov A.V., Burkhanova L.A., Badrtdinova I.I. (2017) Safety and efficacy of p62 DNA vaccine ELENAGEN in a first-in-human trial in patients with advanced solid tumors. *Oncotarget.* 8(32), 53730–53739.
- 33. Cappellano G., Woldetsadik A.D., Orilieri E., Shivakumar Y., Rizzi M., Carniato F., Gigliotti C.L., Boggio E., Clemente N., Comi C. (2014) Subcutaneous inverse vaccination with PLGA particles loaded with a MOG peptide and IL-10 decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Vaccine.* 32, 5681– 5689.
- Jia T., Pan Y., Li J., Wang L. (2013) Strategies for active TNF-α vaccination in rheumatoid arthritis treatment. *Vaccine*. 31, 4063–4068.
- 35. Durez P., Vandepapeliere P., Miranda P., Toncheva A., Berman A., Kehler T., Mociran E., Fautrel B., Mariette X., Dhellin O. (2014) Therapeutic vaccination with TNF-Kinoid in TNF antagonist-resistant rheumatoid arthritis: a phase II randomized, controlled clinical trial. *PLoS One.* **9**(12), e113465.
- Pavshintsev V.V., Mitkin N.A., Frolova O.Y., Kushnir E.A., Averina O.A., Lovat M.L. (2017) Individual roles of brain and serum alcohol dehydrogenase isoforms in regulation of alcohol consumption in SPF Wistar rats. *Physiol. Behav.* 179, 458–466.
- Mitkin N.A., Anokhin P.K., Belopolskaya M.V., Frolova O.Y., Kushnir E.A., Lovat M.L., Pavshintsev V.V. (2020) Active immunization against serum alcohol dehydrogenase normalizes brain dopamine metabolism disturbed during chronic alcohol consumption. *Alcohol.* 83, 17–28.
- Guo C., Manjili M.H., Subjeck J.R., Sarkar D., Fisher P.B., Wang X.-Y. (2013) Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv. Cancer Res.* 119, 421–475.
- 39. Vadalà M., Poddighe D., Laurino C., Palmieri B. (2017) Vaccination and autoimmune diseases: is pre-

vention of adverse health effects on the horizon? *EPMA J*. **8**, 295–311.

- Nicholas D., Odumosu O., Langridge W.H.R. (2011) Autoantigen based vaccines for type 1 diabetes. *Discov. Med.* 11(59), 293–301.
- Zucker S., Pei D., Cao J., Lopez-Otin C. (2003) Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr. Top. Dev. Biol.* 54, 1–74.
- Banerji U., Cook N., Evans T.R.J., Moreno Candilejo I., Roxburgh P., Kelly C.L.S., Sabaratnam N., Passi R., Leslie S., Katugampola S. (2018) A cancer κesearch UK phase I/IIa trial of BT1718 (a first in class bicycle drug conjugate) given intravenously in patients with advanced solid tumours. J. Clin. Oncol. 36(15_suppl), 2610.

https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.TPS2610

SERUM OF MICE IMMUNIZED WITH MT1-MMP METALLOPROTEINASE REDUCES MIGRATION POTENTIAL OF PANCREATIC CANCER CELLS

N. A. Mitkin^{1, *}, A. S. Ustiugova¹, A. N. Uvarova¹, K. A. Rumyantsev², K. V. Korneev¹, and V. V. Pavshintsev³

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia
 ²Moscow Clinical Scientific Center, Moscow, 111123 Russia
 ³Institute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119192 Russia

*e-mail: mitkin.n.a@gmail.com

Expression levels of matrix metalloproteinases, in particular MT1-MMP, are elevated in pancreatic cancer (PC) cells that is associated with increased tumor proliferation, invasion, and migration. MT1-MMP is currently considered as a promising target for drug therapy of PC, but the use of inhibitors and therapeutic antibodies to MT1-MMP is limited because of their maximal efficiency is observed in a narrow time interval, in early asymptomatic stages of the disease. This problem could be solved by the method of immunization to own MMPs at the moment of detection of the primary tumor. Therapeutic effect could be provided by specific antibodies, re-produced in case of relapses. Here, we selected the optimal mode for immunization of mice with MT1-MMP fragments that allows us to obtain a high titer of specific antibodies in the blood serum. The obtained antiserums effectively inhibited MT1-MMP enzymatic activity, migration of PANC-02 PC cells through the collagen matrix and activation of the main inducers of the epithelial-mesenchymal transition, TGF- β and MMP-2. Thus, obtained results could be useful in the development of drugs for PC treatment, and the approach we propose could form the basis for design of antitumor drugs with prolonged action.

Keywords: matrix metalloproteinases, MT1-MMP, peptides, immunization, anti-serum, pancreatic cancer, TGF-β, epithelial-mesenchymal transition, mice, PANC-02

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 577.218

ПРИ ИНИЦИАЦИИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ПОТЕНЦИАЦИИ В НЕЙРОНАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ СУБЪЕДИНИЦА PHF10 РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН КОМПЛЕКСА PBAF МЕНЯЕТ СВОЮ ЛОКАЛИЗАЦИЮ И ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С с-FOS

© 2021 г. А. М. Азиева^{*a*, *b*, *, А. А. Шейнов^{*a*}, Д. А. Кириллова^{*b*}, Е. В. Татарский^{*a*}, С. Г. Георгиева^{*a*, *c*}, Н. В. Сошникова^{*a*}}

^аИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия ^bНациональный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва, 123182 Россия ^cИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия *e-mail: so2615nat@gmail.com Поступила в редакцию 16.10.2020 г. После доработки 15.04.2021 г. Принята к публикации 19.05.2021 г.

Комплекс РВАF, ремоделирующий хроматин, взаимодействует со многими активаторами транскрипции и рекругируется на таргетные участки хроматина. РВАГ играет важную роль в поддержании и изменении структуры хроматина в клетках нервной системы млекопитающих. Субъединица комплекса PBAF – транскрипционный фактор PHF10 – необходим для пролиферации нейрональных предшественников на ранних стадиях развития головного мозга мышей и экспрессии генов в дифференцированных нейронах. Мы показали, что PHF10 взаимодействует с белковым продуктом гена раннего ответа *с-Fos*, транскрипционным активатором с-FOS, который экспрессируется в ответ на индукцию долговременной потенциации (ДВП). Индукция ДВП запускает транскрипцию генов и синтез белков, обеспечивающих изменения, приводящие к установлению долговременных контактов между нейронами. После индукции ДВП в клетках дифференцированной нейрональной культуры начинает экспрессироваться с-FOS, который первоначально локализуется в цитоплазме, а далее перемещается в ядро. PHF10 экспрессируется в нейрональных клетках до индукции ДВП и имеет ядерную локализацию. Однако через 1 ч после индукции PHF10 детектируется в цитоплазме вместе с с-FOS. а затем вместе с ним перемешается в ядро. Важно, что такое поведение PHF10 в ответ на стимуляцию KCl специфично для нейрональных культур. Предполагается, что в процессе ДВП PHF10 совместно с с-FOS участвует в активации генов вторичного ответа, регулирующих поддержание пластических модификаций и гомеостаз синапсов нейронов. Экспорт РНF10 из ядра и его быстрое возвращение вместе с с-FOS в ядро, возможно, необходимо для быстрой модуляции экспрессии таргетных генов вторичного ответа в процессе ДВП.

Ключевые слова: PHF10, PBAF, c-FOS, нейрональные культуры, долговременная потенциация **DOI:** 10.31857/S0026898421060033

введение

Долговременная потенциация (ДВП) — это стабильное усиление синаптической передачи между двумя нейронами, возникающее при повторяющейся передаче сигнала. ДВП лежит в основе установления нейрональных связей в процессе дифференцировки головного мозга млекопитающих, обеспечивает пластичность нейрональных связей и считается одним из основных механизмов, важных для обучения и памяти. Нарушения в ДВП активно изучаются в связи с болезнью Альцгеймера и другими заболеваниями нервной системы.

Хотя сам эффект ДВП был открыт на нейронах гиппокампа кролика, в настоящее время понятно, что он существует во всех отделах головного

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ДВП – долговременная потенциация; ДВР – долговременная репрессия; ПААГ – полиакриламидный гель; DAPI – 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (4',6-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлорид); DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (среда Игла, модифицированная Дюльбекко); FBS – fetal bovine serum (фетальная сыворотка крупного рогатого скота); HEK293T – Human Embryonic Kidney 293T (линия клеток эмбриональной почки человека 293T); PMA – phorbol 12-myristate 13-acetate форболмиристатацетат, форболовый эфир); PBS – фосфатно-солевой буфер.

мозга млекопитающих. Молекулярные механизмы, лежащие в основе ДВП, пока недостаточно изучены. Известно, что ДВП у млекопитающих стимулируется стрессом, факторами роста, нейротрансмиттерами, увеличением концентрации глутаминовой кислоты. Эти факторы приводят к росту концентрации внутрицитоплазматического кальция и активации Ca²⁺-зависимого киназного каскада, который ведет к фосфорилированию транскрипционного фактора CREB [1, 2]. В лабораторных условиях при работе со срезами мозга или культурами клеток ДВП и активацию CREB можно вызвать высокочастотной стимуляцией (тетанизацией) или кратковременным увеличением концентрации внеклеточного калия [3].

Активация CREB запускает экспрессию многих генов, в том числе генов раннего ответа *c-Fos, Arc, Egr1* [4] — мощных активаторов транскрипции, которые инициируют вторую волну экспрессии генов, включающую эффекторные гены, регулирующие поддержание пластических модификаций и гомеостаза синапса [5, 6]. Экспрессия с-FOS служит маркером активности нейронов, представляющей ключевой этап изменения фенотипа клетки, лежащего в основе нейропластичности [7].

Изменение экспрессии генов всегда происходит при участии дополнительных факторов транскрипции, важнейшие из которых – комплексы, ремоделирующие хроматин. Некоторые субъединицы ремоделирующего хроматин комплекса SWI/SNF взаимодействуют с с-FOS [8]. Мультибелковый комплекс SWI/SNF (2 МДа) подразделяется на два подсемейства (BAF и PBAF) и состоит из коровых и специфических модульных субъединиц. Коровые субъединицы выполняют ремоделирующую функцию, а модульные определяют специфичность работы комплекса на генах. Субъединичный состав комплексов SWI/SNF непостоянен и зависит от типа клеток и их функции. Гетерогенные и высокоспецифичные клетки мозга млекопитающего содержат большое количество специфичных субъединиц комплекса SWI/SNF, входящих в его состав на разных этапах нейродифференцировки. Показано, что коровые субъединицы BRG1, BAF155, BAF170 важны на всех стадиях нейрогенеза: при эмбриональном и взрослом нейрогенезе, при созревании нейронов, при формировании астроцитов, олигодендроцитов и Шванновских клеток [9]. Специфические субъединицы, например, BAF53b необходимы для формирования долговременной памяти [10], a Crest/SS18L1 участвует в корректном образовании дендритов [11, 12].

Одна из субъединиц комплекса подсемейства PBAF, играющая важную роль в нейрогенезе, — PHF10 (BAF45a). На разных стадиях развития головного мозга мыши PHF10 экспрессируется в виде четырех изоформ, которые отличаются N- и С-концевыми доменами и подвергаются интенсивному фосфорилированию [13]. PHF10 необходим для поддержания пролиферации клетокпредшественников головного мозга на ранних стадиях его развития [11]. В составе комплекса PBAF PHF10 локализуется на промоторах генов сигнальных путей и способствует привлечению PHK-полимеразы II на эти промоторы [14, 15].

В рамках изучения молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов при ДВП на культуре клеток коры головного мозга новорожденных мышей мы установили, что PHF10 взаимодействует с активатором транскрипции с-FOS, а также изучили динамику экспрессии и локализации белков с-FOS и PHF10 в стимулируемых КСІ нейрональных культурах. Показано, что в отсутствие стимуляции PHF10 экспрессируется и локализуется в ядрах дифференцированной нейрональной культуры. Экспрессия с-FOS начинается после стимуляции ДВП с помощью КСІ. Через 1 ч после стимуляции с-FOS и PHF10 локализуются в цитоплазме клеток, а через 4 ч снова перемещаются в ядро. Необычное изменение локализации PHF10 специфично для нейрональных культур.

Мы предполагаем, что PHF10 совместно с с-FOS участвует в активации генов вторичного ответа, регулирующих поддержание пластических модификаций и гомеостаз синапса. Экспорт PHF10 из ядра и его быстрое возвращение вместе с с-FOS в ядро, возможно, необходимо для быстрой модуляции экспрессии таргетных генов в процессе стимуляции ДВП.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Содержание животных. Работа проведена на первичных культурах мозга новорожденных мышей линии C57BL/6. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, указанным в Приказе Минздрава России № 267 от 19.06.2003 "Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации". Животных содержали в условиях вивария при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота, свободным доступом к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с нормами содержания лабораторных животных.

Получение и культивирование первичной диссоциированной культуры нервных клеток. Предварительно дно чашек обработали поли-*L*-лизином для лучшей адгезии клеток. Клетки мозга новорожденных мышей диссоциировали, обрабатывая 0.25%-ным трипсином ("Invitrogen", США) и распределяли по 300000 клеток в чашку. Жизнеспособность нейронов поддерживали в культуральной нейробазальной среде NeurobasalTM ("Invitrogen") в комплексе с биоактивной добавкой 2% В27 ("Invitrogen"), 0.5 мМ глутамином ("Invitrogen") и пенициллином-стрептомицином ("Life Technologies", США) в инкубаторе GALAXY 170S ("New Brunswick Scientific", США) при постоянных условиях (37°С, 100%-ная влажность и 5% CO₂). Половину объема среды заменяли новой каждые 3 дня [16].

Культивирование клеток линии НЕК293Т. В качестве негативного контроля использовали линию клеток эмбриональной почки человека 293Т (HEK293T) [17].

Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, "GIBCO", США), содержащей 10% сыворотки FBS ("Sigma", США), 2 мМ добавки GlutaMax-I ("GIBCO") и пенициллин-стрептомицин ("Life Technologies") в инкубаторе GALAXY 170S ("New Brunswick Scientific") при постоянных условиях (37°C, 100%-ная влажность, 5% CO₂).

Для последующего иммуноцитохимического анализа из чашек Петри с клетками удаляли старую среду, промывали клетки PBS (1.7 мМ KH_2PO_4 ; 5.2 мМ Na_2HPO_4 ; 150 мМ NaCl), добавляли 0.05% трипсина ("Invitrogen") на 3 мин. Всю среду с клетками помещали в пробирку. Снова центрифугировали в течение 4 мин при 800 об./мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в чистой среде и переносили на покровные стекла, расположенные в чашках Петри.

Клетки НЕК293Т для проведения иммунопреципитации выращивали примерно до 100% монослоя, затем удаляли питательную среду и смывали клетки с чашек Петри, промывали PBS (1.7 мМ КН₂РО₄; 5.2 мМ Na₂HPO₄; 150 мМ NaCl). Полученную суспензию клеток осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 2500 об./мин. После удаления супернатанта клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ HEPES-КОН (pH 7.9), 5 мМ MgCl₂, 0.5% NP-40, 0.45 M NaCl, 1 мМ ДТТ и коктейль ингибиторов протеаз (PIC) ("Roche", Швейцария). После получасового лизиса на льду экстракт центрифугировали в течение 15 мин при 12000 об./мин и температуре 4°С. Затем супернатант разводили тремя объемами буфера, содержащего 10 мМ НЕРЕЅ-КОН (рН 7.9), 5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, PIC и ДНКазу I ("Thermo Fischer Scientific", США). Разбавленный экстракт повторно центрифугировали (12000 об./мин, 15 мин, 4°С).

Трансфекция клеток НЕК293Т. Для временной совместной экспрессии рекомбинантных белков HA-c-FOS и FL-PHF10-Pl/Sl клетки линии HEК293T рассаживали на 60 мм чашки Петри с 50% монослоя. На следующий день к клеткам добавляли смесь ДНК и полиэтиленимина в среде Optimem ("Gibco"). На каждую чашку суммарно

брали 9 мкг плазмид: HA-c-FOS-pcDNA (6 мкг) и одну из Fl-PHF10-Pl-pcDNA (3 мкг) или Fl-PHF10-Sl-pcDNA (3 мкг), или контрольной Fl-pcDNA-MCS (3 мкг), 20 мкл (20 мкг) полиэтиленимина ("Polysciences", ФРГ) и 450 мкл Optimem. На следующий день среду меняли на свежую, спустя 48 ч после трансфекции клетки собирали для последующей иммунопреципитации. Клетки снимали с помощью версена ("Панэко", Россия), осаждали центрифугированием при 2500 об./мин и лизировали с помощью FLB-буфера (40 мМ Трис-HCl, pH 7.8; 100 MM NaCl; 2.5 MM MgCl₂; PIC ("Roche"); PhIC ("Sigma")) на льду. Затем растирали в гомогенизаторе Даунса с пестиком А. центрифугировали в течение 1 мин, супернатант использовали как цитоплазматическую фракцию для последующей иммунопреципитации.

Иммунопреципитация. Иммунопреципитацию проводили с помощью НА-агарозы ("Sigma") или белок А-сефарозы ("Sigma"), предварительно обогащенной антителами к PHF10 (получены ранее в нашей лаборатории [15]).

К сефарозе, связанной с антителами, добавляли суммарный клеточный лизат (2×10^6 клеток), инкубировали в течение ночи при 4°С при постоянном перемешивании. После этого сефарозу последовательно промывали буфером IP500 (25 мМ Трис-HCl (pH 7.9), 5 мМ MgCl₂, 10% глицерина, 100 мМ NaCl, 0.1% NP-40) и буфером IP100 (25 мМ Трис-HCl (pH 7.9), 5 мМ MgCl₂, 10% глицерина, 100 мМ NaCl, 0.1% NP-40). Белки, специфически связавшиеся с антителами, элюировали нагреванием до 99°С в течение 10 мин в 1/10 объема полного клеточного экстракта SDS-содержащим буфером (50 мМ Трис-НСІ (рН 6.8), 10% глицерина, 4% SDS, 4 мМ EDTA, 0.1 М ДТТ, 0.1% бромфенолового синего). Полученные образцы анализировали методом электрофореза в ПААГ.

Стимуляция ДВП. В рамках работы получено 138 культур клеток головного мозга новорожденной мыши. Стимуляцию ДВП в нейронах проводили, добавляя в культуральную среду 50 мМ раствора KCl (3 раза в течение 2 мин в CO₂ инкубаторе), между стимуляциями культуры инкубировали в течение 5 мин в чистой культуральной среде [18].

Иммуноцитохимия. После стимуляции 50 мМ раствором KCl каждую культуру перемещали на лед, чтобы максимально подавить экспрессию генов и другие процессы жизнедеятельности, сразу же отмывали от культуральной среды и фиксировали с помощью 4%-ного параформальдегида в течение 7–10 мин.

После фиксации клетки отмывали 3 раза по 5 мин в однократном растворе PBS (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.4 мМ KH₂PO₄, 4.3 мМ NaH₂PO₄, рН 7.4). Для перфорации плазматической мембраны использовали 0.03%-ный раствор Triton X100 ("Bio-Rad", США) в буфере PBS (5 мин при

комнатной температуре). Для клеток линии НЕК293Т использовали 0.3%-ный раствор Triton X100.

Неспецифическое связывание перед аппликацией антител снижали с помощью инкубации клеток с 3%-ным раствором БСА ("Sigma") в PBS в течение 30 мин.

Клетки одновременно подвергали реакциям иммуногистохимического окрашивания на белок с-FOS, а также на клеточные ядра с помощью ДНК-специфического маркера DAPI ("Sigma").

Клетки инкубировали в течение 12–13 ч при температуре 4°C с первичными мышиными антителами к с-FOS ("Invitrogen") и кроличьими к PHF10 (получены в нашей лаборатории). Раствор антител готовили в PBS в объеме 300 мкл с добавлением 3% БСА. После инкубации клетки отмывали раствором PBS (3 раза в течение 3–5 мин). После этого проводили инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом: Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse ("Invitrogen") и Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit ("Invitrogen").

После инкубации клетки отмывали раствором PBS (3 раза в течение 3–5 мин). Затем ядра окрашивали DAPI (1 мкг/мл в течение 10 мин) и заключали в водную заливочную среду Fluoromount ("Sigma") на предметных стеклах.

Микроскопия. Флуоресцентную микроскопию образцов выполняли при одной и той же интенсивности возбуждающего света и экспозиции на конфокальном микроскопе Olympus Fluoview 10i. Сначала создавали обзорную карту препарата для навигации путем автоматической сшивки полей зрения объектива × 10. Далее детектировали флуоресцентные метки в интересующих полях зрения (объективы ×10 и ×60) с одновременным получением изображений по методу фазового контраста.

Фотографировали флуоресцентный сигнал красной метки Alexa Fluor 647 в каждом поле зрения, свидетельствующий об экспрессии белка PHF10, сигнал зеленой метки Alexa Fluor 568, свидетельствующий об экспрессии белка с-FOS, флуоресцентный сигнал голубой метки DAPI, указывающий на общее количество клеточных ядер, а также вид культуры в белом свете.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

PHF10 взаимодействует с с-FOS

PHF10 входит в состав ремоделирующего хроматин комплекса PBAF и является коактиватором транскрипции, способствуя привлечению PHK-полимеразы II на таргетные гены [15]. Ранее показали, что PHF10 экспрессируется в пролиферирующих и дифференцированных нейронах в виде нескольких изоформ, играющих разную роль в активации транскрипции [13, 14]. Кроме того, PHF10 влияет на экспрессию генов многих сигнальных путей, регулируемых факторами транскрипции — продуктами генов раннего ответа, в том числе активатором транскрипции с-FOS [14].

Поэтому изучено взаимодействие эндогенного PHF10 с активатором транскрипции с-FOS. Экспрессию с-FOS в клетках НЕК293Т индуцировали путем обработки форболовым эфиром (PMA) в течение 2 ч. Далее с помощью антител к PHF10 проводили коиммунопреципитацию белков из экстракта клеток. Осажденные белки разделяли в SDS-ПААГ с последующим вестерн-блотингом, мембрану окрашивали антителами к с-FOS и PHF10.

Полученные данные показывают, что уровень изоформ PHF10 в клетках не меняется после обработки PMA (рис. 1*a*, верхняя панель, inputs). Как и ранее в наших работах [13, 15, 19–21], PHF10 был представлен несколькими полосами, соответствующими различным изоформам с разной степенью фосфорилирования. При иммунопреципитации практически весь PHF10 осаждался антителами (рис. 1*a*, верхняя панель).

Обработка РМА индуцирует экспрессию с-FOS в клетках НЕК293Т (рис. 1*a*, нижняя панель, inputs). При этом с-FOS соосаждается антителами к PHF10 (рис. 1*a*, нижняя панель). Некоторая размытость полосы, соответствующей с-FOS (рис. 1*a*), связана с тем, что подвижность с-FOS в ПААГ примерно совпадает с подвижностью антител.

Прямое взаимодействие между транскрипционным активатором с-FOS и PHF10 подтверждали путем совместной экспрессии рекомбинантного белка HA-с-FOS и изоформ Fl-PHF10-Pl (Fl-Pl) или Fl-PHF10-Sl (Fl-Sl) с последующим осаждением HA-с-FOS из цитоплазматической фракции клеток НЕК293Т на НА-агарозу. Как показано нами ранее, рекомбинантные изоформы Fl-PHF10i при сверхэкспрессии частично локализуются в цитоплазме в несвязанном с комплексом PBAF состоянии [20]. После осаждения на HA-агарозу изоформы Fl-PHF10-Pl/Sl выявили с помощью вестерн-блотинга во фракциях, в которых экспрессируется также HA-c-FOS (рис. 1δ). В контрольных фракциях HA-с-FOS и Fl-PHF10-Sl (Fl-Sl) неспецифический сигнал не наблюдали.

Таким образом, PHF10, субъединица ремоделирующего хроматин комплекса PBAF, взаимодействующая с активатором с-FOS и PHF10, может участвовать в активации транскрипции с-FOS-зависимых генов.

При стимуляции ДВП в нейрональных культурах PHF10 перемещается из ядра в цитоплазму, а затем транслоцируется в ядро вместе с с-FOS

На первой стадии ДВП наблюдается первичная однократная стимуляция нейронов и кратко-


Рис. 1. *а* – Коиммунопреципитация с-FOS из лизата клеток HEK293T с помощью антител к PHF10. Верхняя панель – вестерн-блот, окрашенный антителами к PHF10. Нижняя панель – вестерн-блот, окрашенный антителами к c-FOS. PHF10-IP – осаждение антителами к PHF10, output – истощенный антителами лизат после осаждения. Стрелками показаны формы с-FOS, которые копреципитируются антителами к PHF10. δ – Коиммунопреципитация Fl-PHF10-Pl/Sl (две изоформы PHF10 – Fl-Pl и Fl-Sl) из лизата клеток HEK293T при совместной экспрессии с HA-c-FOS с помощью антител к HA-эпитопу. Верхняя панель – вестерн-блот, окрашенный антителами к Flag-эпитопу. Нижняя панель – вестерн-блот, окрашенный антителами к Flag-эпитопу. Нижняя панель – вестерн-блот, окрашенный антителами к HA-эпитопу. HA-c-FOS и Fl-PHF10-Sl (Fl-Sl) использованы в качестве контроля неспецифического осаждения на HA-агарозу. HA-IP – осаждение HA-c-FOS-антителами к HA-эпитопу. Input – исходный клеточный лизат. Справа указаны молекулярные массы (55 и 70 кДа) маркерных белков.

временная экспрессия генов, ответственных за возникновение синапсов при последующей долговременной стимуляции. *с-Fos* — это ген раннего ответа, и белок с-FOS начинает транслироваться в цитоплазме нейронов в ответ на стимуляцию ДВП через 30-90 мин [3]. При определенных стимулах с-FOS может локализоваться не только в ядре, но и в цитоплазме и дендритах нейронов, например клеток Пуркинье [22]. Ранее мы обнаруживали и ядерную, и цитоплазматическую локализацию PHF10 в клетках [15]. Быстрое изменение локализации транскрипционных факторов – транспорт из цитоплазмы в ядро или из ядра в цитоплазму с возможной последующей деградацией или возвращением в ядро, может быть одним из вариантов регуляции экспрессии генов.

Мы предположили, что взаимодействие с-FOS и PHF10 может обуславливать их одновременное перемещение между ядром и цитоплазмой нейрона. На культуре клеток головного мозга новорожденных мышей изучена динамика экспрессии и локализации белков с-FOS и PHF10 при стимуляции ДВП с помощью KCl. Первичные нервные клетки после выделения культивировали в течение 22 дней до достижения состояния зрелых нейронов. Далее для индукции ДВП культуру обрабатывали 50 мМ KCl и последовательно фикси-

ровали с промежутком 1 ч в течение 6 ч. Иммуноокрашивание клеток антителами, специфически узнающими с-FOS, показало, что с-FOS появляется в нейрональных клетках через 1 ч после стимуляции ДВП. Первоначально с-FOS локализуется в цитоплазме, затем постепенно транслоцируется в ядро и через 5–6 ч после индукции становится полностью ядерным (рис. 2).

Интересно, что PHF10 присутствует в ядрах нейрональных клеток до индукции ДВП. Однако через 1 ч после индукции локализация PHF10 меняется на цитоплазматическую (рис. 2).

Далее локализация PHF10 и с-FOS совпадает: через 4 ч PHF10 вместе с с-FOS перемещается обратно в ядро. Полностью PHF10 и с-FOS находились в ядрах через 5 ч после обработки нейрональной культуры KCl (рис. 2).

Таким образом, с-FOS начинает интенсивно экспрессироваться в ответ на стимуляцию нейрональных культур KCl и в течение 5 ч транслоцируется из цитоплазмы в ядро. PHF10 после стимуляции KCl быстро (в течение 1 ч) перемещается в цитоплазму, но затем через 5 ч возвращается вместе с с-FOS в ядро.



Рис. 2. Иммуноцитохимический анализ экспрессии и локализации транскрипционных активаторов PHF10 и с-FOS в первичных диссоциированных нейрональных культурах в ответ на стимуляцию 50 мМ KCl. Белыми стрелками обозначены ядра (иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к PHF10). Белая шкала в секторе DAPI, 0 ч обозначает масштаб, равный 20 мкМ. PHF10 + DAPI – наложение двух каналов – PHF10 и DAPI.

Изменение локализации PHF10 при стимуляции KCl специфично для нейрональной культуры

Явление ДВП, наблюдаемое в первичных диссоциированных нейрональных культурах в ответ на стимуляцию KCl, специфично для зрелых нейронов. Мы выявили изменение локализации транскрипционного коактиватора PHF10 в этих культурах и проверили специфичность этого свойства для нейронов. В качестве контроля использовали культуру клеток HEK293T, в которой PHF10 экспрессируется на высоком уровне.

Клетки НЕК293Т высаживали на стекла, обрабатывали КСІ и фиксировали с такими же временными промежутками (в течение 6 ч с интервалом 1 ч). Мы выполнили окрашивание PHF10 антителами и выявили постоянную интенсивную локализацию PHF10 в ядре в каждой временной точке после обработки КСІ (рис. 3). Ядерная локализация PHF10 не изменялась в ответ на стимуляцию клеток HEK293T с помощью KCI.

Таким образом, изменения локализации PHF10 специфичны для нейрональных культур. Быстрая транслокация PHF10 из ядра в цитоплазму и последующая колокализация с с-FOS может быть связана с особенностями регуляции экспрессии генов в ответ на стимуляцию ДВП.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Транскрипционный фактор с-FOS является сильным активатором транскрипции. В частно-

сти, с-FOS активирует гены пролиферации, нейропластичности и гены ответа на стресс. В процессах активации генов важную роль играют также коактиваторные комплексы – ремоделеры хроматина. В частности, ремоделирующий хроматин комплекс PBAF важен для пролиферации и дифференцировки нейрональных клеток головного мозга млекопитающих [13–15]. Мы показали, что с-FOS взаимодействует с одной из специфических субъединиц комплекса PBAF – PHF10, которая отвечает за связывание комплекса с хроматином на регуляторных областях гена и за привлечение на промотор PHK-полимеразы II [15].

Транскрипция гена FOS характерна для недавно активированных нейронов и необходима для ДВП – усиления синаптической передачи сигнала между нейронами, сохраняющейся на протяжении длительного времени [23]. На срезах коры головного мозга крысы показано, что максимальная экспрессия с-FOS наблюдается через 1.5 ч после стимуляции [24]. А на срезах гиппокампа мыши установлено, что экспрессия с-FOS максимальна через 2 ч после стимуляции нейронов [25]. В наших экспериментах, выполненных на первичной нейрональной культуре, максимальный уровень экспрессии с-FOS наблюдали через 3 ч, а максимальную концентрацию с-FOS в ядре – через 5-6 ч. Возможно, это связано с недостаточной дифференцировкой первичной культуры нейрональных клеток, культивированных на чашках.

Также мы изучили изменение локализации PHF10. Белок PHF10, самый нестабильный из



Рис. 3. Иммуноцитохимический анализ экспрессии и локализации PHF10 в клетках HEK293T в ответ на стимуляцию 50 мМ KCl. Белыми стрелочками обозначены ядра (иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к PHF10). Белая шкала в секторе DAPI 0 ч обозначает масштаб, равный 20 мкМ. PHF10 + DAPI – наложение двух каналов – PHF10 и DAPI.



Рис. 4. Схема экспрессии и транслокации с-FOS и PHF10 в нейрональных клетках в ответ на стимуляцию ДВП с помощью KCl. До стимуляции PHF10 в составе комплекса PBAF находится в ядре, отвечая за транскрипцию некоторого набора генов (0ч-KCl). Через 1 ч после стимуляции в цитоплазме начинает экспрессироваться с-FOS, а PHF10 транслоцируется из ядра в цитоплазму. Предполагается, что экспрессия таргетных генов прекращается. PHF10 взаимодействует с с-FOS (1ч-KCl. Через 5 ч после стимуляции с-FOS и PHF10 локализуются в ядре, стимулируя транскрипцию других генов – генов вторичного ответа, активируемых с-FOS (5ч-KCl). 0ч-KCl, 1ч-KCl, 5ч-KCl – время с момента обработки KCl нейрональных клеток – до обработки, 1 и 5 ч соответственно.

всех субъединиц PBAF, сильно фосфорилирован и частично локализуется в цитоплазме клеток [20]. Обычно белки, обладающие этими свойствами, интенсивно регулируются в ответ на внешние стимулы и сами действуют как активаторы различных транскрипционных процессов. Быстрая транслокация транскрипционного фактора из ядра в цитоплазму – еще один способ регуляции транскрипции. Например, FOXO1 в ответ на стимуляцию IGF-1 фосфорилируется киназой Akt1 и экспортируется из ядра. При этом активируются многие гены фазы G1/S клеточного цикла [26]. Еще один пример – онкосупрессор Rb, который при обработке миофибрилл скелетных мышц человека TNF-а фосфорилируется киназой CDK4 и также уходит из ядра, что приводит к снятию репрессии генов, отвечающих за пролиферацию клеток [27].

В ответ на обработку клеток KCl PHF10 быстро перемещается из ядра в цитоплазму, что может приводить к ингибированию ряда генов, активно транскрибирующихся и ремоделирующихся комплексом PBAF. Однако затем вместе с с-FOS, активатором PHF10, возвращается в ядро, что ведет к активации паттернов других генов, ответственных за синаптогенез и формирование пластичности нервной ткани. Возможно также, что с-FOS, взаимодействует с PHF10 в цитоплазме, и PHF10 способствует его транслокации в ядро на таргетные сайты хроматина для последующей активации специфических генов (рис. 4).

Таким образом, изменение локализации PHF10 и его колокализация с активатором с-FOS может регулировать изменение паттернов экспрессирующихся генов в ответ на стимуляцию ДВП. Работа поддержана грантом Российского научного фонда (18-14-00303), выданному Н.В. Сошниковой.

Условия содержания экспериментальных животных соответствовали нормативам, указанным в Приказе Минздрава России № 267 от 19.06.2003 "Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации".

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ghosh A., Ginty D.D., Bading H., Greenberg M.E. (1994) Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *J. Neurobiol.* 25, 294–303.
- Mermelstein P.G., Bito H., Deisseroth K., Tsien R.W. (2000) Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J. Neurosci.* 20, 266– 273.
- Fleck M.W., Palmer A.M., Barrionuevo G. (1992) Potassium-induced long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 580, 100–105.
- Minatohara K., Akiyoshi M., Okuno H. (2016) Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 243.

https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00078

- 5. Gallo F.T., Katche C., Morici J.F., Medina J.H., Weisstaub N.V. (2018) Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: focus on *c-Fos, Egr1* and *Arc. Front. Behav. Neurosci.* **12**, 79.
- 6. Sheng M., Greenberg M.E. (1990) The regulation and function of *c*-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. **4**, 477–485.
- Oma Y., Harata M. (2011) Actin-related proteins localized in the nucleus. *Nucleus*. 2, 38–46.
- Li X., Wang W., Wang J., Malovannaya A., Xi Y., Li W., Guerra R., Hawke D.H., Qin J., Chen J. (2015) Proteomic analyses reveal distinct chromatin-associated and soluble transcription factor complexes. *Mol. Syst. Biol.* 11, 775.
- Sokpor G., Xie Y., Rosenbusch J., Tuoc T. (2017) Chromatin remodeling BAF (SWI/SNF) complexes in neural development and disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 78.
- Vogel-Ciernia A., Matheos D.P., Barrett R.M., Kramár E.A., Azzawi S., Chen Y., Magnan C.N., Zeller M., Sylvain A., Haettig J., Jia Y., Tran A., Dang R., Post R.J., Chabrier M., Babayan A.H., Wu J.I., Crabtree G.R., Baldi P., Baram T.Z., Lynch G., Wood M.A. (2013) The neuron-specific chromatin regulatory subunit BAF53b is necessary for synaptic plasticity and memory. *Nat. Neurosci.* 16, 552–561.
- 11. Qiu Z., Ghosh A. (2008) A calcium-dependent switch in a CREST-BRG1 complex regulates activity-dependent gene expression. *Neuron*. **60**, 775–787.

- Staahl B.T., Tang J., Wu W., Sun A., Gitler A.D., Yoo A.S., Crabtree G.R. (2013) Kinetic analysis of np-BAF to nBAF switching reveals exchange of SS18 with CREST and integration with neural developmental pathways. *J. Neurosci.* 33, 10348–10361.
- Азиева А.М., Шейнов А.А., Галкин Ф.А., Георгиева С.Г., Сошникова Н.В. (2018). Влияние фосфорилирования субъединиц ремоделирующего хроматин комплекса PBAF на их стабильность в головном мозге мыши. ДАН. 479, 212–215.
- Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A., Wan M., Winslow M.M., Staahl B.T., Wu H., Aebersold R., Graef I.A., Crabtree G.R. (2007) An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron*. 55, 201–215.
- Brechalov A.V., Georgieva S.G., Soshnikova N.V. (2014) Mammalian cells contain two functionally distinct PBAF complexes incorporating different isoforms of PHF10 signature subunit. *Cell Cycle.* 13, 1970–1979.
- Sokolov I., Azieva A., Burtsev M. (2016) Patterns of spiking activity of neuronal networks *in vitro* as memory traces. In: Advances in Intelligent Systems and Computing. Biologically Inspired Cognitive Architectures (BICA) for Young Scientists. Cham Springer Internat. Publ., 241–247.
- 17. Stepanenko A.A., Dmitrenko V.V. (2015) HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyo-type, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene.* **569**, 182–190.
- Schoenenberger P., Gerosa D., Oertner T.G. (2009) Temporal control of immediate early gene induction by light. *PloS One.* 4, e8185.
- Бречалов А.В., Валиева М.Е., Георгиева С.Г., Сошникова Н.В. (2016) Изоформы белка PHF10 подвергаются фосфорилированию в составе ремоделирующего хроматин комплекса PBAF млекопитающих. *Молекуляр. биология*. 50(2), 320–326.
- Tatarskiy V.V., Simonov Y.P., Shcherbinin D.S., Brechalov A.V., Georgieva S.G., Soshnikova N.V. (2017) Stability of the PHF10 subunit of PBAF signature module is regulated by phosphorylation: role of β-TrCP. *Sci. Rep.* 7, 5645.
- Sheynov A., Feoktistov A., Georgieva S., Soshnikova N. (2019) AKT kinase phosphorylates PHF10, a subunit of PBAF chromatin remodeling complex. *FEBS Open Bio*. 9, 124.
- 22. Tian J.B., Bishop G.A. (2002) Stimulus-dependent activation of c-Fos in neurons and glia in the rat cerebellum. *J. Chem. Neuroanat.* 23, 157–170.
- Flavell S.W., Greenberg M.E. (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 563–590.
- 24. Chaudhuri A., Zangenehpour S., Rahbar-Dehgan F., Ye F. (2000) Molecular maps of neural activity and quiescence. Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.). **60**, 403–410.
- Gandolfi D., Cerri S., Mapelli J., Polimeni M., Tritto S., Fuzzati-Armentero M.-T., Bigiani A., Blandini F., Mapelli L., D'Angelo E. (2017) Activation of the CREB/c-Fos pathway during long-term synaptic plasticity in the cerebellum granular layer. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 184.

1028

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

- Schachter T.N., Shen T., Liu Y., Schneider M.F. (2012) Kinetics of nuclear-cytoplasmic translocation of Foxo1 and Foxo3A in adult skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol.*—*Cell Physiol.* **303**, C977–C990.
- 27. Araki K., Kawauchi K., Hirata H., Yamamoto M., Taya Y. (2013) Cytoplasmic translocation of the retinoblastoma protein disrupts sarcomeric organization. *eLife*. **2**, e01228.

PHF10, A SUBUNIT OF THE PBAF CHROMATIN REMODELING COMPLEX, CHANGES ITS LOCALIZATION AND INTERACTS WITH c-FOS DURING THE INITIATION OF LONG-TERM POTENTIATION IN THE NEURONAL CULTURE

A. M. Azieva^{1, 2, *}, A. A. Sheynov¹, D. A. Kirillova², E. V. Tatarskiy¹, S. G. Georgieva^{1, 3}, and N. V. Soshnikova¹

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia
 ² National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia
 ³ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia
 *e-mail: so2615nat@gmail.com

The chromatin-remodeling complex PBAF interacts with many transcriptional activators and is recruited to the target chromatin regions. PBAF plays an important role in maintaining and modifying chromatin structure in mammalian cells. Transcription factor PHF10, a subunit of the PBAF complex, is required for the proliferation of neuronal progenitors during early stages of mouse brain development and gene expression in differentiated neurons. We have shown that PHF10 interacts with the protein c-FOS, a protein of the early response gene c-fos. The c-FOS is transcriptional activator, which is expressed in response to induction of longterm potentiation (LTP). LTP induction triggers the transcription of genes with following proteins synthesis that provide neuronal changes leading to long-term contacts between neurons. We have shown that after LTP induction, c-FOS is initially localized in the cytoplasm and then moves to the nucleus in cells of a differentiated neuronal culture. Before LTP induction PHF10 is expressed in nucleus of neuronal cells. However, 1 h after induction, PHF10 is detected in the cytoplasm together with c-FOS, and then both of them move into the nucleus. Importantly, this behavior of PHF10 in response to KCl stimulation is specific for neuronal cultures. It is assumed that during LTP, PHF10, together with c-FOS, participates in the activation of secondary response genes that regulate the maintenance of plastic modifications and homeostasis of neuronal synapses. The export of PHF10 from the nucleus and its rapid return together with c-FOS to the nucleus are possibly necessary for the rapid modulation of the expression of targeted secondary response genes during LTP.

Keywords: PHF10, PBAF, c-FOS, neuronal cultures, long-term potentiation

- СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ -

УДК 57.013

РАСЧЕТ ЭНЕРГИИ ФОРМИРОВАНИЯ ДУПЛЕКСОВ РНК/РНК И ДНК/РНК НА ОСНОВАНИИ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

© 2021 г. В. М. Голышев^{а, b}, Д. В. Пышный^{а, b}, А. А. Ломзов^{а, b, *}

^а Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отеления Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^bНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: lomzov@niboch.nsc.ru Поступила в редакцию 07.03.2021 г. После доработки 21.05.2021 г. Принята к публикации 21.05.2021 г.

Создание подходов прогностического расчета гибридизационных свойств нуклеиновых кислот (HK), а также различных классов их производных считается фундаментом для рационального дизайна конструкций на их основе. Современные достижения в области методов компьютерного моделирования свидетельствуют о возможности таких вычислений. В работе впервые проанализирована возможность расчета энергии формирования ДНК/РНК- и РНК/РНК-дуплексов на примере представительных наборов комплексов (65 и 75 комплексов соответственно). Мы использовали метод классической молекулярной динамики (МД), методы MMPBSA или MMGBSA для расчета энтальпийной (ΔH°) составляющей и квазигармоническое приближение (Q-Harm) или метод анализа нормальных мод колебаний (NMA) для расчета энтропийной (ΔS°) составляющей энергии Гиббса

 (ΔG_{37}°) образования НК-комплексов. Показано, что, используя метод MMGBSA при анализе МДтраектории только НК-дуплекса с учетом эмпирической линейной аппроксимации, можно рассчитывать энтальпию формирования ДНК, РНК и гибридных комплексов различной длины и GC-состава с точностью 8.6%. В рамках каждого типа комплексов комбинация достаточно производительных методов MMGBSA и Q-Harm, в применении к траектории только бимолекулярного комплекса,

позволяет рассчитать величину ΔG_{37}° образования дуплекса с достоверностью 10%. Высокая точность прогностического расчета для разных типов природных комплексов (ДНК/ДНК, ДНК/РНК и РНК/РНК) указывает на большую вероятность распространения рассмотренного подхода на аналоги и производные НК. Это в перспективе даст принципиальную возможность перейти к рациональному дизайну новых типов НК-направленных сиквенсспецифических соединений.

Ключевые слова: термическая стабильность, гибридизация, молекулярная динамика, ДНК/РНК, РНК/РНК, дуплексы, MMPBSA, MMGBSA, олигонуклеотиды **DOI:** 10.31857/S0026898421060069

Производные и аналоги нуклеиновых кислот (HK) используют для решения задач таргетной терапии различных заболеваний [1, 2], биосенсорных технологий, молекулярно-биологических исследований [3] и биотехнологии [4]. На данный момент известно множество различных производных HK, которые обладают улучшенными относительно природных аналогов свойствами [4]. Несмотря на это, они не в полной мере удовлетворяют потребностям исследователей, а их использование на практике часто ограничено патентным правом. Таким образом, создание новых производных, обладающих заранее заданными биологическими и физико-химическими свойствами, остается актуальной задачей химии и физической химии НК. К одному из важнейших свойств таких аналогов относится их способность взаимодействовать с комплементарными последовательностями НК и эффективность этого взаимодействия. На сегодняшний день не существует способов оценки гибридизационных свойств производных НК на этапе, предшествующем их хи-

Сокращения: МД — молекулярная динамика; НК — нуклеиновая кислота; MMGBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area) — покомпонентный метод расчета изменения свободной энергии на основе симуляции методом молекулярной динамики по обобщенной модели Борна; MMPBSA (Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area) — покомпонентный метод расчета изменения свободной энергии на основе симуляции методом молекулярной динамики по модели Борна; MMPBSA (Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area) — покомпонентный метод расчета изменения свободной энергии на основе симуляции методом молекулярной динамики по модели Борна; NMA (Normal Mode Analysis) — анализ нормальных мод колебаний; Q-Harm (Quasi-Harmonic approximation) — квазигармоническое приближение.

мическому синтезу. Для хорошо изученных соединений разработан ряд подходов, основанных на анализе эмпирических зависимостей, позволяющих рассчитывать энергию формирования их комплексов с ДНК [5-11] и/или РНК [12] или температуру плавления [13, 14] в зависимости от длины и нуклеотидного состава взаимодействующих цепей. В случае новых соединений необходимо использовать подходы, которые не опираются на полученную экспериментальным путем информацию по их гибридизационным свойствам. Для достаточно больших соединений, состоящих более чем из 100 атомов, подходят методы, основанные на молекулярной механике и/или молекулярной динамике (МД). За последнее десятилетие наблюдается большой прогресс в области разработки различных подходов для расчета термодинамических параметров межмолекулярных взаимодействий [15]. Среди них наиболее распространены методы MMPBSA (Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area) [16] и MMGBSA (Molecular Mechanics/ Generalized Born Surface Area) [17, 18], методы анализа потенциала средней силы (PMF): например, метод анализа взвешенных диаграмм (WHAM) [19] или метод анализа вариационного профиля свободной энергии (vFEP) [20]. Также за последнее десятилетие разработан ряд подходов, которые позволяют эффективно покрывать рассматриваемое фазовое пространство для более эффективного расчета свободной энергии. Среди них можно выделить методы алхимических превращений [21]: например, методы возмущения свободной энергии (FEP) [22] и термодинамического интегрирования (TI) [23]. К их недостаткам можно отнести необходимость больших затрат вычислительных мощностей и времени расчета, которое необходимо для получения достоверных результатов моделирования, в результате чего вышеупомянутые подходы не могут быть применены для расчета энергий набора комплексов различной длины и GC-состава.

Для оценки энергии комплексообразования очень популярны такие простые и вычислительно эффективные техники, как MMGBSA и MMPBSA. В этих методах для каждой конформации молекул рассчитывают энергии всего комплекса и его составных частей, полученные при МД-моделировании, а растворитель (который был представлен в моделировании в явном виде) заменяют на непрерывную среду с заданной диэлектрической проницаемостью. В этих подходах энергия связывания (ΔG_{bind}) состоит из изменения суммарной молекулярно-механической энергии $(\Delta E_{\rm MM}),$ энергии сольватации ($\Delta G_{
m solv}$) и вклада конформационной энтропии ($T\Delta S$) [24]:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{solv}} - T\Delta S. \tag{1}$$

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

В свою очередь в величину $\Delta E_{\rm MM}$ вносит вклад внутренняя энергия ($\Delta E_{\rm int}$) (деформация связей, углов и двугранных углов), электростатическая энергия ($\Delta E_{\rm ele}$) и вандерваальсовые взаимодействия ($\Delta E_{\rm vdW}$):

$$\Delta E_{\rm MM} = \Delta E_{\rm int} + \Delta E_{\rm ele} + \Delta E_{\rm vdW}.$$
 (2)

Сольватационная энергия равна сумме вкладов от полярного ($\Delta G_{\rm PB/GB}$) и неполярного ($\Delta G_{\rm SA}$) взаимодействия исследуемой молекулы с растворителем:

$$\Delta G_{\rm solv} = \Delta G_{\rm PB/GB} + \Delta G_{\rm SA}.$$
 (3)

Первый член уравнения, $\Delta G_{\rm PB/GB}$, — электростатическая энергия, которая может быть рассчитана либо при прямом решении уравнения Пуассона—Больцмана (PB, метод MMPBSA), либо при помощи обобщенного метода Борна (GB, метод MMGBSA). Вклад неполярных взаимодействий, $\Delta G_{\rm SA}$, обычно представляют в виде линейной функции от площади молекулы, доступной для взаимодействия с растворителем (*SASA*) [25]:

$$\Delta G_{\rm SA} = \gamma \cdot SASA + b, \tag{4}$$

где ү и *b* – коэффициенты линейного уравнения.

Для расчета свободной энергии Гиббса энтропийный вклад, учитывающий конформационную составляющую, обычно рассчитывают методами анализа нормальных мод колебаний (NMA) [26] или квазигармонического приближения (Q-Harm) [27]. Первый характеризуется высокой сложностью вычислений и позволяет проанализировать энтропийный вклад только для небольшого числа снимков МД-траектории (до нескольких тысяч), в то время как второй работает существенно быстрее и эффективнее.

Такие методы оценки энергии межмолекулярных взаимодействий широко используют при исследовании взаимодействий биополимеров с малыми молекулами: например, в молекулярно-биологических исследованиях [28] или при разработке новых лекарственных препаратов [29]. Кроме того, продемонстрировано успешное применение этих подходов для расчета энергии формирования комплексов как нативных [30, 31], так и химически модифицированных олигонуклеотидов с ДНК и РНК [32–36]. Однако в последнем случае исследования не носят систематического характера – скорее, это иллюстрация возможностей методов.

Создание подхода прогностического расчета гибридизационных свойств разных классов производных НК может стать фундаментальной основой для рационального дизайна таких соединений и последующего направленного поиска способов их химического синтеза. Для этого на первом этапе требуется проверка применимости расчетов на уже хорошо исследованных немодифицированных комплексах НК с последующим распространением на новые, в том числе еще не синтезированные, аналоги НК. Ранее нами продемонстрировано успешное применение подходов MMPB(GB)SA для расчета энергии и оценки термостабильности набора более 300 ДНК/ДНКдуплексов [30]. В рамках развития этих исследований мы проанализировали возможность расчета гибридизационных свойств ДНК/РНК- и РНК/РНК-комплексов, используя классический метод МД.

Целью работы была проверка применимости методов MMPBSA и MMGBSA для расчета энтальпийной составляющей и Q-Harm и NMA для расчета энтропийной составляющей энергии Гиббса формирования ДНК/РНК- и РНК/РНК-дуплексов. В ходе исследования проведено моделирование методом МД представительных наборов олигонуклеотидов и их комплексов. Полученные траектории проанализированы с использованием подходов MMPBSA и MMGBSA, а энтропия рассчитана методами NMA и Q-Harm. Данные проанализировали и сравнили с экспериментально полученными значениями термодинамических параметров формирования комплексов олигонуклеотидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

База данных термодинамических параметров. Экспериментальные значения термодинамических параметров формирования НК-комплексов взяты из литературных источников. В случае комплементарных ДНК/РНК-дуплексов использованы данные, опубликованные Sugimoto и др. [7]. Из рассмотрения были исключены дуплексы, содержащие фосфатные остатки на 3'-конце. Таким образом, база данных включала термодинамические параметры комплексообразования для 65 дуплексов длиной от 5 до 12 п.о. (в среднем 8 п.о.) и с GC-составом от 0 до 84% (в среднем 53%). Для комплементарных РНК/РНК-дуплексов использованы данные, полученные Хіа и др. [37]. Из рассмотрения были также исключены дуплексы, содержащие концевые фосфатные группы. Таким образом, база данных включала термодинамические параметры комплексообразования для 75 дуплексов длиной от 4 до 11 п.о. (в среднем 7 п.о.) и долей G/С-пар от 22 до 100% (в среднем 58%).

Подготовка молекулярных систем для моделирования. Структуры дуплексов были созданы в программе NAB пакета программ AmberTools14 [38] и при помощи программы Chimera [39]. Стартовые структуры РНК/ДНК- и РНК/РНК-дуплексов имели А-форму двойной спирали. Одноцепочечные олигонуклеотиды были получены из дуплексов путем удаления одной из цепей.

Молекулярно-динамическое моделирование. МДмоделирование проведено с применением пакета

программ AMBER 14 с использованием параллельных вычислений на центральных процессорах и графических ускорителях программно-аппаратной архитектуры CUDA. Для ДНК использовали силовое поле ff99bsc0 [40], а для РНК ff99bsc0+chiOL3 [41]. МД-моделирование проводили в явной водной оболочке при температуре 300 К. Электростатические взаимодействия описывали методом сети частиц Эвальда с шагом решетки 1 Å. Давление в системе было равно 1 бар (баростат Берендсена), температура в системе поддерживалась при помощи масштабирования скоростей с периодом привязки 10 пс. Для увеличения шага интегрирования уравнений движения до 2 фс использовали алгоритм SHAKE. Использовали область расчета нековалентных взаимодействий (nonbonded cutoff) 10 Å. Координаты каждого атома системы записывали каждые 10 пс моделирования. Дуплексы и одноцепочечные олигонуклеотиды были помещены в кубическую ячейку с расстоянием 12 Å от моделируемой молекулы до границ ячейки. Количество воды в моделируемой ячейке было в диапазоне от 4000 до 8000 молекул. Для нейтрализации отрицательного заряда НК в периодической ячейке использовали ионы натрия.

Процедура моделирования состояла из следующих шагов:

1) Создание PDB-файла, содержащего данные о координатах каждого атома в структуре дуплекса или одноцепочечной HK.

2) Создание водного окружения (модель воды TIP3P, кубические периодические условия, 12 Å) и добавление ионов натрия для нейтрализации периодической системы.

3) Минимизация всей системы с фиксированной НК (10000 шагов минимизации) (PMEMD.MPI).

4) Нагрев системы с фиксированной НК в течении 2.5 нс с шагом интегрирования 0.5 фс от 0 до 300 К (PMEMD.CUDA).

5) Уравновешивание плотности системы при постоянном давлении 1 бар в течении 500 пс (SANDER) с зафиксированной HK.

6) Уравновешивание системы при постоянном давлении 1 бар и температуре 300 К в течении 5 нс (PMEMD.CUDA).

7) МД-моделирование в течение 100 нс в NPTансамбле (1 бар, 300 К) (PMEMD.CUDA).

8) Расчет энергии формирования комплексов при помощи методов MMGBSA и MMPBSA, расчет энтропии в Q-Нагт и NMA (MMPBSA.MPI). Вычисления проводили при использовании только траектории дуплекса (однотраекторный подход) и при использовании независимо полученных траекторий дуплекса и одноцепочечных олигонуклеотидов (трехтраекторный подход). Для вычисления методом MMGBSA использовали параметры обобщенного метода Борна, предложенные Tsui & Case [17]. Ионная сила раствора была установлена равной 100 мМ. Для расчета методами MMGBSA и MMPBSA и Q-Harm использовали каждый записанный снимок МДтраектории, в случае NMA – каждую десятую сохраненную конформацию.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ранее нами показано, что применение компьютерных расчетов для определения гибридизационных свойств ДНК/ДНК-дуплексов может давать точность, сопоставимую с точностью экспериментальных методик [30]. Именно поэтому мы использовали методику МД-моделирования и расчета энергии формирования дуплексов в применении к ДНК/РНК- и РНК/РНК-комплексам. Использована база данных величин термодинамических параметров комплексообразования, включающая экспериментальные значения энтальпии, энтропии и свободной энергии Гиббса формирования НК-дуплексов. Характеристики наборов данных приведены в разделе "Экспериментальная часть".

На первом этапе исследований были созданы молекулярные структуры и проведен расчет методом МД в явной водной оболочке в течении 100 нс для набора 65 дуплексов ДНК/РНК [7] и 75 дуплексов РНК/РНК [37], а также одноцепочечных олигонуклеотидов, входящих в их состав. В случае самокомплементарных олигонуклеотидов расчеты проводили с двумя различными начальными скоростями атомов. Полученные МД-траектории анализировали.

Анализ структуры комплексов

По результатам моделирования РНК/РНКдуплексов структура А-формы двойной спирали сохраняется вдоль всей траектории длиной 100 нс для каждого из 75 проанализированных комплексов. Отклонение геометрии спирали от исходной неуравновешенной структуры при моделировании не превышает 2.5 Å – величины среднеквадратичного отклонения (СКО) между атомами. Комплексы после уравновешивания в течение 10 нс незначительно изменяли конформацию в течение последующих 90 нс моделирования. Среднее значение СКО вдоль МД-траектории для всего набора комплексов составило 1.56 Å и не превышало 2.56 Å для каждого снимка траектории. В 11 из 74 исследуемых дуплексов наблюдалось расплетание концевых пар нуклеотидов. В ряде случаев для дуплексов с концевыми A/U- или A/T-парами происходило обратимое разрушение второй пары оснований, при этом концевой аденин и предконцевой нуклеотид этой же цепи сохраняли конформацию, близкую к таковой в двойной спирали.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

При моделировании ДНК/РНК-дуплексов отклонение от стартовой структуры не превышало 4.1 Å. В 17 из 64 исследуемых структур наблюдали расплетание концевых пар, аналогично случаю бимолекулярных РНК/РНК-комплексов. Среднее значение СКО вдоль МД-траектории для всего набора комплексов составило 2.26 Å и не превышало 3.86 Å для каждого снимка траектории.

Структуры ДНК/РНК- и РНК/РНК-дуплексов несколько отличались. Анализ РНК/РНКкомплексов с помощью программного обеспечения X3DNA [42, 43] выявил, что такие комплексы имеют А-форму двойной спирали. Структуру ДНК/РНК-дуплексов можно охарактеризовать как промежуточную между А- и В-формами. Такое различие конформаций известно и показано экспериментальными методами: ЯМР-спектроскопией [44], рентгеноструктурным анализом [45] и спектроскопией кругового дихроизма [44, 46, 47]. В связи с особенностями структуры гомонуклеотидных последовательностей в ДНК/РНКи РНК/РНК-дуплексах [48, 49] мы исключили их из рассмотрения.

При МД-анализе одноцепочечных олигонуклеотидов обнаружены значительные конформационные перестройки как в ДНК-, так и в РНКцепях. В большинстве случаев наблюдали локальное разрушение одноцепочечного стэкинга между прилегающими основаниями, а в некоторых случаях формирование внутримолекулярных шпилечных структур, которые могут быть достаточно устойчивыми на длине траектории в 100 нс. Это приводит к существенно большим значениям СКО – как усредненным вдоль траектории (5.3 Å лля РНК- и 5.7 Å для ДНК-цепи – в среднем для всех исследованных олигонуклеотидов), так и их максимальным отклонениям от начальных структур (8.0 и 9.5 Å для РНК- и ДНК-цепей соответственно). Такое поведение одноцепочечных форм типично для НК, что следует из опубликованных экспериментальных данных [50, 51] и результатов компьютерного моделирования [52-54].

Энергия формирования РНК/РНК-комплексов

Энергию формирования комплексов НК определяли как разницу энергий двухцепочечного и одноцепочечного состояний. С использованием данных МД-моделирования рассчитывали изменение внутренней энергии комплексообразования, используя методы MMPBSA и MMGBSA. Для расчета вклада конфигурационной энтропии применяли методы NMA и Q-Harm. Определение вклада одноцепочечных состояний проводили, используя анализ МД-траекторий двух отдельных олигонуклеотидов (трехтраекторный подход, 3tr). Альтернативно из МД-траектории НК-дуплексов вычленяли отдельные олигонуклеотиды и использовали полученный набор конформаций для расчетов



Рис. 1. Корреляционный анализ значений термодинамических параметров, определенных экспериментально и рассчитанных на основании МД-анализа, для РНК/РНК-дуплексов. a - Значения энтальпии (ΔH^0) рассчитаны методами MMGBSA с использованием анализа одной (1tr) и трех (3tr) траекторий. $\delta - З$ начения энергии Гиббса при 37°С (ΔG_{37}°) определены экспериментально и на основании анализа одной МД-траектории комбинацией методов MMGBSA и NMA или Q-Harm. Порядок расположения уравнений соответствует порядку подписей на рисунках.

(однотраекторный подход, ltr). Расчет энергии Гиббса комплексообразования проводили, используя все возможные комбинации полученных значений энтальпии и энтропии формирования комплексов в рамках одно- или трехтраекторного подхода.

Сопоставление экспериментально определенных величин термодинамических параметров и значений, полученных с использованием одно- и трехтраекторных подходов для РНК/РНК-комплексов, приведено на рис. 1 и в табл. 1. Наилучшая корреляция экспериментальных и расчетных значений энтальпии комплексообразования была при использовании метода MMGBSA и трехтраекторного подхода. Коэффициент корреляции R^2 (где *R* – коэффициент корреляции Пирсона) между экспериментальными и рассчитанными величинами составлял 0.72; при этом угловой коэффициент линейной зависимости был близок к единице (0.95), а коэффициент сдвига составлял всего 4.6 ккал/моль. При использовании данной зависимости для расчета энтальпии комплексообразования средняя абсолютная величина ошибки ее предсказания составила 8.1 ккал/моль, или 16.3%. При использовании метода MMPBSA корреляция экспериментальных и расчетных величин была гораздо хуже, чем для MMGBSA – средняя абсолютная ошибка была гораздо выше в случае однотраекторного подхода и существенно ниже при трехтраекторном рассмотрении (табл. 1).

Введение линейной эмпирической поправки к рассчитанным величинам энтальпии комплексообразования, полученной из корреляции расчетных и экспериментальных значений ($\Delta H^{\circ}($ эксп) = $= a \cdot \Delta H^{0}(MД) + b$), приводит к тому, что величина абсолютной ошибки снижается до уровня 3.7 ккал/моль, а относительной – до 8.1% при расчетах методом MMGBSA (3tr), что ниже типичной экспериментальной точности определения энтальпии комплексообразования (10%) [37].

Величину энтропии формирования комплекса рассчитывали методами Q-Нагт и NMA при анализе одной или трех независимых траекторий. Сопоставление рассчитанных и экспериментальных значений показывает, что наилучшая корреляция ($R^2 = 0.67$) наблюдается при использовании квазигармонического приближения при анализе одной траектории (табл. 1). Среднее значение величины относительной ошибки расчета энтропии в этом случае составляет 83.4 кал · моль⁻¹ · K⁻¹, или 54%. Это в процентном отношении значимо хуже, чем при оптимальном методе расчета энтальпии методом MMPGSA с использованием трехтраекторного анализа. При трехтраекторном анализе ошибки расчета энтропии комплексообразования в 1.2-2.5 раз ниже, хотя наблюдаемые корреляции существенно хуже. Необходимо отметить, что в линейных зависимостях коэффициент пропорциональности между расчетными и экспериментальными величинами энтропий лежит в диапазоне 1.13-2.40, а свободный член линейной зависимости в диапазоне -34.99...+16.48 кал · моль $^{-1}$ · K $^{-1}$. Это показывает, что конфигурационная энтропия в значительной степени коррелирует с энтропией комплексообразования, но не вносит в нее определяющий вклад. Использование линейной

N ^b	Метод расчета	а	b	R^2	$\langle \Delta E \rangle^{\rm c}$	$\langle \Delta E / E \rangle, \%$	$\langle \Delta E^* \rangle^{\rm c}$	$\langle \Delta E^* / E^* \rangle, \%$
				ΔH°				
1++	MMGBSA	0.98	5.20	0.66	7.2	14.5	5.1	9.29
111	MMPBSA	0.68	-33.39	0.16	21.9	38.3	7.9	14.61
2+=	MMGBSA	0.95	4.60	0.72	8.1	16.3	3.7	8.09
511	MMPBSA	1.06	5.78	0.68	5.0	10.1	4.1	8.81
				ΔS°				
1++	Q-Harm	2.40	13.64	0.67	83.4	54.0	13.5	8.73
111	NMA	1.47	16.48	0.60	118.4	77.2	14.6	9.47
2+=	Q-Harm	1.68	-15.12	0.63	70.6	45.9	12.3	9.16
50	NMA	1.13	-34.99	0.42	48.2	30.0	14.8	11.93
				ΔG_{37}°				
	MMPBSA + Q-Harm	0.14	-6.22	0.18	5.5	79.3	1.40	19.22
1+=	MMGBSA + Q-Harm	0.29	4.00	0.85	31.9	433.8	0.68	8.63
Itr	MMPBSA + NMA	0.07	-8.08	0.07	10.6	145.5	1.54	20.62
	MMGBSA + NMA	0.30	-0.15	0.77	17.7	238.2	0.74	10.92
	MMPBSA + Q-Harm	0.22	-0.48	0.50	22.9	331.2	0.89	18.34
3tr	MMGBSA + Q-Harm	0.22	0.78	0.58	28.1	407.3	0.84	18.05
30	MMPBSA + NMA	0.22	-2.26	0.52	16.1	226.9	0.92	18.26
	MMGBSA + NMA	0.26	0.15	0.71	20.9	297.5	0.87	17.85

Таблица 1. Сопоставление значений термодинамических параметров, определенных экспериментально и полученных при анализе МД-траекторий, для РНК/РНК-дуплексов^а

^аЗдесь и далее: коэффициенты *a* и *b* определены методом наименьших квадратов из корреляции расчетных и экспериментальных величин термодинамических параметров в рамках каждого метода расчета – например, для величин энтальпии: $\Delta H^{\circ}($ эксп.) = $a \cdot \Delta H^{\circ}(M \square) + b$; R^2 – коэффициент корреляции этой зависимости. $\langle |\Delta E| \rangle$ и $\langle |\Delta E| \rangle / |E| \rangle$ – среднее значение абсолютной и относительной ошибки расчета термодинамического параметра. Значения $\langle |\Delta E^*| \rangle$ и $\langle |\Delta E^*| / |E^*| \rangle$ рассчитаны после линейной коррекции (коэффициенты *a* и *b*) величин термодинамических параметров, полученных методами компьютерного анализа.

^b Число траекторий при анализе.

^с Размерность средней абсолютной ошибки расчета энтальпии и свободной энергии Гиббса комплексообразования – ккал · моль⁻¹, энтропии – кал · моль⁻¹ · K⁻¹.

поправки для приближения расчетных величин энтропии комплексообразования к экспериментальным данным дает значимое снижение ошибки расчета до 8.7% при использовании квазигармонического приближения в рамках однотраекторного подхода (табл. 1). Менее достоверная предсказательная способность энтропии при трехтраекторном подходе, скорее всего, связана с неполным покрытием конфигурационного пространства одноцепочечных олигомеров при данной длине траектории в рамках метода классической МД. Кроме того, наблюдаемое значимое различие в энтропии также зависит от ионной силы раствора, которая при моделировании отличается от стандартных условий (1 M NaCl, нейтральные значения pH), в которых были проведены экспериментальные исследования. В одном из классических представлений влияние концентрации одновалентных ионов на термостабильность межмолекулярных НК-комплексов может быть представлено в виде энтропийной поправки, пропорциональной логарифму концентрации катионов в растворе и числу отрицательно заряженных фосфатных остатков в НК-цепи [37, 55, 56]. Такая зависимость соответствует наблюдаемому тренду линейной зависимости экспериментальных и расчетных значений энтропии формирования дуплексов. Однако в полной мере учесть этот вклад в термостабильность НК-дуплексов в рамках применения метода классической МД не представляется возможным.

Величину свободной энергии Гиббса наиболее часто используют на практике при сопоставлении гибридизационных свойств олигонуклеотидов [55, 56]. Этот параметр определяет величину константы равновесия в соответствии с уравнением



Рис. 2. Корреляционный анализ значений термодинамических параметров, определенных экспериментально и рассчитанных на основании МД-анализа, для PHK/PHK-дуплексов. a – Прогностическая эффективность метода ближайших соседей (БС; 5'-NN/NN-3') для расчета энтальпии образования PHK/PHK-дуплексов, определенной экспериментально (Эксп.) и с использованием метода MMGBSA при анализе трех траекторий (MMGBSA, 3tr). δ – Сопоставление инкрементов модели ближайших соседей для PHK/PHK-комплексов, опубликованных ранее Xia и соавт. [37], определенных на основании экспериментальных данных (Эксп.) и рассчитанных с использованием метода MMPBSA при анализе трех траекторий (MMGBSA, 3tr). Порядок расположения уравнений соответствует порядку подписей на рисунках. Иниц. – фактор инициации формирования двойной спирали.

Вант-Гоффа и, следовательно, соотношение концентраций одно- и двухцепочечного состояния олигонуклеотидов в растворе при различных температурах. При расчете энергии Гиббса формирования дуплексов при одно- и трехтраекторном подходах рассмотрена прогностическая способность комбинаций методов расчета энтропии и энтальпии. Результаты анализа корреляций расчетных и экспериментальных значений приведены на рис. 1 и в табл. 1. Наилучшая корреляция с $R^2 = 0.85$ наблюдается при использовании однотраекторного анализа методами MMGBSA и Q-Нагт при оценке соответственно энтальпии и энтропии комплексообразования. Наблюдается значительный наклон (a = 0.29) и ненулевой коэффициент сдвига составлял (b = -4.0 ккал/моль) данной линейной зависимости (рис. 16). Это приводит к большим значениям величины абсолютной ошибки. Как видно из данных для прогноза энтальпии и энтропии комплексообразования (табл. 1), оба этих компонента вносят вклад в отличный от единицы наклон корреляции расчетных и экспериментальных значений изменения свободной энергии Гиббса и в пересечение с осью абсцисс не в нулевой точке. Учет линейной корреляции существенно снижает ошибку – до 0.68 ккал/моль, или 8.63%, - что фактически совпадает со средней экспериментальной ошибкой для НК-дуплексов (~7%) [37].

Проведенный анализ показывает достаточно близкие экспериментальные и расчетные значения (без учета линейных поправок) энергии комплексообразования только для изменения энтальпии, рассчитанного методом MMGBSA в рамках трехтраекторного анализа. Сопоставимые значения ошибок дает модель ближайших соседей [37]. Мы сравнили опубликованные ранее инкременты формирования динуклеотидных шагов спирали и инкременты, рассчитанные на основании собранной нами экспериментальной базы данных и соответствующих величин, полученных с помощью компьютерного анализа (рис. 2).

Модель ближайших соседей одинаково хорошо описывает экспериментальные данные и величины, рассчитанные методом MMPBSA с использованием трех траекторий (рис. 2*a*). Все инкременты значимы (*p*-value $< 4 \times 10^{-6}$), за исключением инкремента фактора инициации для экспериментальных данных (*p*-value = 0.14).

Представленные в литературе и определенные нами на основании экспериментальных и расчетных данных величины формирования динуклеотидных пар близки между собой и одинаковы в рамках погрешностей, за исключением инкрементов для GA/UC и GC/CG, полученных из компьютерных расчетов методом MMPBSA (рис. 26). В этом случае разница с экспериментально определенными величинами для исследованной базы данных составляет 4.3 и 3.8 ккал/моль соответственно. Наиболее значимое различие наблюдается для фактора инициации (рис. 26, инкремент "Иниц."), величина которого составляет -9.9 ккал/моль при анализе МД-траекторий и +5.9 ккал/моль при анализе этой же базы данных



Рис. 3. Корреляционный анализ значений термодинамических параметров, определенных экспериментально и рассчитанных на основании МД-анализа, для ДНК/РНК-дуплексов. a - Значения энтальпии (ΔH°) рассчитаны методами MMGBSA с использованием анализа одной и трех траекторий. $\delta - З$ начения энергии Гиббса при 37° С (ΔG°_{37}) определены экспериментально и на основании анализа одной МД-траектории комбинацией методов MMGBSA и NMA или Q-Harm. Порядок расположения уравнений соответствует порядку подписей на рисунках.

экспериментальных значений, что, вероятно, связано с низкой значимостью инкремента, определенного на основании экспериментальных данных. Аналогично более отрицательной оказывается поправка, связанная с существованием концевой А/U-пары: +5.4 против +9.4 ккал/моль соответственно. Это может быть связано с не вполне корректным учетом взаимодействия концевых пар оснований, в том числе недостаточно длинной МД-траекторией, чтобы учесть эффект открывания концевых пар с высокой достоверностью. Вместе с тем совокупность полученных данных указывает на алекватность использованного полхола. включающего моделирование методом МД (силовое поле, способ моделирования) и расчет энергии методом MMPBSA для учета взаимодействий внутри дуплексной структуры РНК.

Энергия формирования ДНК/РНК-комплексов

В случае гибридных ДНК/РНК-дуплексов выявлена линейная корреляция расчетных и экспериментальных величин энтальпии комплексообразования (рис. 3, табл. 2). Корреляцию по изменениям энтальпии наблюдали только при анализе одной траектории методом MMGBSA ($R^2 = 0.71$). Наклон корреляционной прямой зависимости близок к единице (a = 0.841), а свободный член близок к нулю (b = -0.982 ккал/моль). Для этого способа расчета энтальпии относительная ошибка составляла 23%, а абсолютная — 12.0 ккал/моль. Во

всех остальных случаях коэффициент корреляции R^2 не превышал значения 0.64. Вместе с тем при трехтраекторном анализе методом MMPBSA значение ошибки расчета оказалось минимальным (16% и 11.4 ккал/моль) при отсутствии корреляции ($R^2 = 0.13$), как и в случае PHK/PHK-комплексов (табл. 1 и 2).

Введение линейной поправки приводит к снижению ошибки до уровня 8.2% (5.1 ккал/моль) в случае метода MMGBSA при анализе траектории только ДНК/РНК-дуплексов, близкой к таковой для РНК/РНК-комплексов.

Значения энтропии формирования ДНК/РНКкомплексов, рассчитанные методом NMA при анализе одной траектории, дают наилучшую корреляцию с экспериментальными величинами (R^2 = = 0.74), при этом среднее значение абсолютной ошибки составляет 47.5 кал \cdot моль⁻¹ \cdot K⁻¹, или 29% (табл. 2). В случае использования квазигармонического приближения в однотраекторном анализе величина коэффициента корреляции оказалась меньше, $R^2 = 0.55$, а среднее значение абсолютной ошибки составляло 78.2 кал \cdot моль⁻¹ \cdot K⁻¹, или 49%. Коэффициент пропорциональности между расчетными и экспериментальными значениями энтропии ДНК/РНК-комплексов лежит в диапазоне 1.3-1.8, а свободный член линейной зависимости в диапазоне -3.0...+41 кал · моль $^{-1}$ · К $^{-1}$, что указывает на существенные различия значений энтропии формирования комплекса, определенных экспериментально и рассчитанных значений конфигурационной энтропиии. Коэффициент корреляции и наклон близки к таковым в случае РНК/РНК-комплексов (табл. 1 и 2), что указывает на общую природу наблюдаемых закономерностей для разных типов комплексов.

Расчет энтропии формирования РНК-содержащих дуплексов в рамках квазигармонического приближения при анализе одной траектории дает хорошую линейную корреляцию с экспериментальными данными, однако наклон линейной аппроксимации существенно отличаются от единицы, что затрудняет применение такого подхода для оценки полной энтропии комплексообразования. Стоит отметить, что расчет энтропии в квазигармоническом приближении на несколько порядков быстрее, чем при анализе нормальных мод колебаний. Это оправдывает применение Q-Нагт-приближения при оценке энергии Гиббса для большого набора ДНК/РНК- и РНК/РНКкомплексов.

Величины энергии Гиббса формирования гибридных комплексов, рассчитанные на основании метода MMGBSA и конфигурационных энтропий, в высокой степени коррелируют с экспериментальными значениями для ДНК/РНК-дуплексов (рис. 3). Коэффициенты корреляции, R^2 , составляют 0.82 и 0.78 при расчете энтропии методами Q-Нагт и NMA соответственно. В остальных случаях значимой корреляции не наблюдается ($R^2 < 0.06$).

Проведенный анализ применимости модели ближайших соседей для описания величин энтальпии комплексообразования выявил высокую прогностическую эффективность такой модели в применении к данным, полученным экспериментально и методом MMPBSA при анализе одной траектории (рис. 4а). Инкременты модели ближайших соседей, описывающие фактор инициации формирования комплексов, не были статистически значимыми – для экспериментальных и расчетных наборов данных *p*-value равнялись 0.11 и 0.69 соответственно. При анализе экспериментальной базы данных низкозначимыми оказываются динуклеотидные пары CU/AG и UU/AA. Для величин энтальпий, рассчитанных при однотраекторном анализе методом MMGBSA, все инкременты, кроме фактора инициации, были статистически значимыми (*p*-value $< 4 \times 10^{-5}$).

Таблица 2. Сравнение значений термодинамических параметров, определенных экспериментально и полученных при анализе МД-траекторий, для ДНК/РНК-дуплексов^а

N	Метод расчета	а	b	R^2	$\langle \Delta E \rangle^{\rm b}$	$\langle \Delta E / E \rangle, \%$	$\langle \Delta E^* \rangle^{\rm b}$	$\langle \Delta E^* / E^* \rangle, \%$
				ΔH°				
1 tr	MMGBSA	0.84	1.0	0.71	12.0	22.9	5.1	8.2
111	MMPBSA	0.49	-44.7	0.64	25.1	44.0	8.9	10.8
3tr	MMGBSA	0.56	-22.3	0.32	11.3	21.3	7.9	12.6
511	MMPBSA	0.41	-36.9	0.13	11.4	16.0	8.7	13.8
				ΔS°				
1tr	Q-Harm	1.81	-15.3	0.55	78.2	49.0	19.0	14.3
111	NMA	1.77	41.1	0.74	47.5	29.2	14.3	8.4
3tr	Q-Harm	1.33	-31.8	0.66	60.9	38.3	16.8	9.5
50	NMA	1.55	-3.0	0.53	57.6	35.5	20.0	11.4
			Δ	G°_{37}				
	MMPBSA + Q-Harm	0.05	-6.97	0.04	4.7	81.0	1.94	23.4
1tr	MMGBSA + Q-Harm	0.19	1.60	0.82	35.8	561.1	0.62	9.3
111	MMPBSA + NMA	0.02	-7.38	0.00	10.5	171.6	2.01	24.2
	MMGBSA + NMA	0.21	0.24	0.78	26.3	407.0	0.69	9.6
	MMPBSA + Q-Harm	-0.04	-8.39	0.06	18.4	317.2	1.46	24.7
3tr	MMGBSA + Q-Harm	0.00	-7.36	0.00	26.8	451.4	1.43	24.3
311	MMPBSA + NMA	-0.01	-7.65	0.01	17.0	287.1	1.45	24.6
	MMGBSA + NMA	0.03	-6.13	0.03	25.5	423.0	1.38	23.5

^а Все обозначения и размерности см. в табл. 1.





Рис. 4. Корреляционный анализ значений термодинамических параметров, определенных экспериментально и рассчитанных на основании МД-анализа, для ДНК/РНК-дуплексов. a – Прогностическая эффективность метода ближайших соседей (БС) для расчета энтальпии образования ДНК/РНК-дуплексов, определенной экспериментально (Эксп.) и с использованием метода MMGBSA при анализе трех траекторий (MMGBSA, 1tr). δ – Сопоставление инкрементов модели ближайших соседей для ДНК/РНК-комплексов, опубликованных ранее Sugimoto и соавт. [7], определенных на основании экспериментальных данных (Эксп.) и с использованием метода MMPBSA при анализе одной траектории (MMGBSA, 1tr). Порядок расположения уравнений соответсвует порядку подписей на рисунках.

Опубликованные ранее и определенные нами величины инкрементов для экспериментальных данных существенно различались для фактора инициации и динуклеотидных пар, у которых в РНК-цепи с 5'-конца находится цитозин (rCX/dX'G, где X = A, С, U или G) или гуанин (rGX/dX'C), за исключением динуклеотидной пары rGU/dAC (рис. 4б). Определенные нами инкременты rCX/dX'G имеют амплитуды ниже, а rGX/dX'С – выше, чем представленные в литературе. Также более низкий вклад в стабильность двойной спирали имеют инкременты UG и UU. Сопоставление инкрементов при анализе собранной нами базы данных показывает, что величины инкрементов rCX/dX'G, rGG/dCC и rGU/dAC экспериментальных энтальпий комплексообразования существенно ниже таковых при их определении методом MMGBSA из анализа одной МД-траектории. Это может быть связано с несогласованностью силовых полей для ДНК и РНК при моделировании гибридных комплексов, которые были оптимизированы для ДНК/ДНК- и РНК/РНК-дуплексов. Кроме того, относительно малая выборка и низкое разнообразие длин и нуклеотидных композиций модельных комплексов приводит к достаточно высокому значению ошибок для отдельных инкрементов модели ближайших соседей (рис. 4б). Расширение выборки в перспективе позволит получить более надежные результаты.

Отрицательные значения факторов инициации и концевых пар, полученные при МД-анализе данных с помощью модели ближайших сосе-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

дей, превышают таковые для данных из экспериментального анализа для комплексов ДНК/ДНК [30], РНК/РНК и ДНК/РНК. Это указывает на систематическую разницу при моделировании методом МД или расчетах методом MMGBSA. Методом ЯМР показано, что концевые пары оснований находятся в постоянном равновесии между открытым и закрытым состояниями [57], к тому же открытие концевых пар наблюдается не для всех комплексов. Такие события не относятся к многократно повторяющимся в рамках рассматриваемой траектории для каждого моделируемого комплекса. что не позволяет провести достоверный учет вкладов от концевых пар оснований при расчете термодинамических параметров. Несмотря на это, метод MMGBSA дает наилучшую корреляцию экспериментальных и расчетных величин для всех трех типов комплексов.

В результате проведенного нами исследования продемонстрирована возможность расчета термодинамических параметров образования НКкомплексов с использованием подходов, основанных на методе классической МД. При анализе наборов дуплексов РНК/РНК, ДНК/РНК и ДНК/ДНК [30] выявлено, что энтальпия формирования комплексов, рассчитанная методом ММGBSA при анализе МД-траектории только комплекса, в среднем обладает наилучшей корреляцией расчетных и экспериментальных величин для каждого типа комплексов ($R^2 > 0.73$). Ошибка расчета энтальпии формирования комплексов (15–30%) значительно выше типичной экспери-



Рис. 5. Корреляционный анализ значений энтальпии (*a*) и свободной энергии Гиббса (*б*), определенных экспериментально и рассчитанных методом MMGBSA с использованием одной траектории, для разных типов комплексов. Данные по ДНК/ДНК-комплексам взяты из работы Lomzov и др. [30]. Порядок расположения уравнений соответствует порядку подписей на рисунках.

ментальной величины (~10%). Высокая корреляция также наблюдается при расчете энтропии в рамках квазигармонического приближения однотраекторного анализа. Однако в этом случае наклон и свободный член линейной зависимости существенно отличались соответственно от единицы и нуля. Как видно из графиков, представленных на рис. 5, по анализу корреляций для экспериментальных и рассчитанных значений энтальпии комплексообразования дуплексов ДНК/ДНК [30], РНК/РНК и ДНК/РНК углы наклона и свободные члены всех линейных уравнений для этих трех пар близки. Мы объединили все полученные в ходе работы данные для определения общей универсальной зависимости, использование которой позволит пересчитывать значения, рассчитанные методом MMGBSA в однотраекторном приближении. Такая линейная функция имеет следующий вид: $\Delta H^{\circ}($ эксп.) = 0.727 · $\Delta H^{\circ}($ MMBBSA, 1tr) - 5.32.

Использование данной линейной коррекции позволяет значительно снизить относительную ошибку расчета энтальпии комплексообразования до 9.3 (7.8), 12.8 (9.9) и 7.5% (6.3%) соответственно для РНК/РНК, ДНК/РНК и ДНК/ДНК (в скобках указана дисперсия для приведенных величин). В среднем для всех типов комплексов ошибка расчета составляла 8.6%, что ниже типичного значения экспериментальной ошибки (10%).

Значительно более высокий уровень корреляции наблюдается между величиной энергии комплексообразования, рассчитанной методом MMGBSA в однотраекторном приближении, и экспериментальной величиной свободной энер-

гии Гиббса при одновременном рассмотрении всех типов комплексов ($R^2 = 0.897$). Однако при более углубленном анализе выявлено, что для каждого из рассмотренных типов комплексов встречаются сушественно различающиеся межлу собой линейные зависимости, а наибольшее значение R² найдено для выборки из 304 ДНК/ДНКкомплексов. Различия в коэффициентах линейной зависимости связаны, в том числе, с энтропией, вклад которой различен для разных типов комплексов – как по конфигурационной, так и сольватационной составляющей, учитывающей взаимодействие с ионами. Эта гипотеза подтверждается различными линейными зависимостями для экспериментально определенной свободной энергии Гиббса и для рассчитанной на основании энтальпии, полученной методом MMGBSA (1tr), и энтропии в квазигармоническом приближении (табл. 1 и 2). Таким образом, приведенные на рис. 56 линейные зависимости могут быть применены для расчета свободной энергии Гиббса на основании значений энергии комплексообразования, рассчитанных методом MMGBSA в однотраекторном приближении, только в рамках конкретного типа комплексов. Величины ошибки таких расчетов с учетом поправок в виде линейных функций со своими коэффициентами для каждого типа комплексов дают ΔG_{34}° 9.9 (6.7), 10.3 (9.0) и 8.0% (6.9%) соответственно для РНК/РНК, ДНК/РНК и ДНК/ДНК (в скобках указана дисперсия для приведенных величин).

Использование величин изменения внутренней энергии, рассчитанной методом MMGBSA, и конфигурационной энтропии в квазигармоническом приближении для расчета энергии Гиббса формирования дуплекса дает результаты, которые с высоким коэффициентом корреляции линейно связаны с экспериментально определяемыми значениями. Такая зависимость наблюдается для наборов РНК/РНК, ДНК/РНК и ДНК/ДНК различной длины и GC-состава. Вместе с тем высокая дисперсия ошибки расчета указывает на то, что необходимо либо использовать методы более полного покрытия конформационного пространства (sampling-методы), либо проводить анализ для большого числа комплексов различной длины и нуклеотидного состава – с целью достоверного сопоставления рассчитанных данных для разных типов комплексов.

Использование методов компьютерного моделирования с более полным покрытием конформационного пространства при анализе траекторий позволяет определять величину свободной энергии Гиббса. В опубликованных ранее работах показана принципиальная возможность достижения экспериментальной точности (~1 ккал/моль). Применяя метод зонтичной выборки (umbrella sampling) при использовании в качестве координаты расстояния между концами шпилечной структуры РНК, а также метод анализа взвешенных гистограмм (WHAM). L. Smith и др. [58] получили высокую согласованность экспериментальных и расчетных величин свободной энергии. Главный недостаток такого подхода заключается в необходимости получения чрезвычайно длительной МД-траектории – около 200 мкс. Более экономичной может быть комбинация методов алхимических превращений и обмена репликами. В этом случае установлено, что при замене одного основания на другое, того же класса (пуринового или пиримидинового), в РНК-дуплексе размером 6 п.о. точность расчета энергии, связанной с однонуклеотидной заменой, составляет 0.55 ккал/моль [22]; при этом продолжительность МД-траектории небольшая — порядка 1 мкс, что на порядок больше, чем в предлагаемом нами подходе.

Методы МД применяют не только для анализа структуры и гибридизационных свойств нативных олигонуклеотидов, но и для их аналогов и производных - с целью установления их возможной пространственной структуры, влияния модификаций на термостабильность комплексов с НК и причин наблюдаемых физико-химических и молекулярно-биологических эффектов. Для расчета энергии формирования модифицированных комплексов рассматривали замкнутые НК (LNA) [59], пептидил-НК (PNA) [35], 2'-О-Ме-производные РНК [34], глицин-морфолиновые аналоги [32] и фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды [33]. Применяли различные подходы, среди которых наиболее распространен использованный и нами метод MMPB(GB)SA. В большинстве случаев показана корреляция рассчитанных энергий с

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

экспериментальными характеристиками термостабильности: энтальпией, свободной энергией Гиббса комплексообразования или температурой плавления. Однако количественного согласования расчетных значений энергий с наблюдаемыми экспериментально при использовании большинства подходов не наблюдается. Это дополнительно усугубляется тем, что обычно анализируют небольшое число комплексов близкой длины и/или GCсостава. В совокупности полученные данные свидетельствует о невозможности количественного сопоставления энергии Гиббса формирования разных типов комплексов, например олигонуклеотидов с измененной химической структурой, при использовании методов классической МЛ и методов ММРВ(GB)SA для расчета энтальпии и Q-Harm или NMA для расчета энтропии комплексообразования. Проведенные нами исследования показывают возможность количественного сопоставления энтальпии формирования РНК/РНК-, ДНК/РНК- и ДНК/ДНК-комплексов. Справедливо ли это утверждение для производных НК, можно будет понять по результатам анализа набора их комплексов, различной длины и GC-состава, с применением предложенного нами подхода.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном исследовании проанализирована возможность использования метода МД для прогнозирования величины энергии формирования НК-дуплексов. Для расчета энтальпии комплексообразования использованы методы MMPBSA и MMGBSA, а энтропии – Q-Harm и NMA. Анализ проводили, используя только МДтраекторию НК-дуплекса или три траектории (двухцепоченого состояния и одноцепочечных олигонуклеотидов). Величину энергии Гиббса формирования дуплексов оценивали, используя комбинации величин энтропии и энтальпии, определенных разными методами в рамках одно- или трехтраекторного подходов. В ряде случаев полученные данные характеризовались высоким значением коэффициента корреляции экспериментальных и рассчитанных величин.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что количественный расчет энтальпии комплексообразования допустимо проводить для PHK/PHK-, ДНК/PHK- и ДНК/ДНК-комплексов, используя метод MMGBSA в однотраекторном приближении с применением линейной эмпирической корректировки. Получаемая таким способом величина энтальпии с точностью 8.6% совпадает с экспериментальной. Значения энтропии и свободной энергии Гиббса можно сравнивать количественно только в рамках одного типа комплексов. В этом случае однотраекторный подход и комбинация методов MMGBSA и Q-Harm дают наибольшую точность: в среднем 8.2 и 9.3% соответственно для РНК/РНК- и ДНК/РНК-дуплексов — с учетом линейной поправки для каждого типа комплекса. Использование двух этих способов расчета наиболее вычислительно эффективно и дает точную количественную оценку термодина-мических параметров комплексообразования.

Для распространения предлагаемого подхода на аналоги или производные НК необходимо достоверно рассчитать структуру олигомеров и их комплексов с НК. Как только такие структуры или ансамбли структур будут найдены, метод можно использовать для быстрой оценки гибрилизационной способности производных HK. Paнее, на глицин-морфолиновых олигомерах [32] и отдельных фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидах [33], нами показано, что рассчитанные предлагаемым методом энтальпии комплексообразования близки экспериментально определенным значениям. Однако для количественной оценки достоверности предлагаемого метода необходимы дополнительные исследования на наборе олигомеров различной длины и GC-состава.

Для количественного расчета энтальпии формирования дуплексов можно рекомендовать метод MMGBSA с анализом траектории дуплексной структуры — как эффективный и не слишком времязатратный. В перспективе предложенные нами подходы могут быть также распространены на аналоги и производные нуклеиновых кислот, что даст принципиальную возможность перейти к рациональному дизайну новых типов соединений.

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования "Сибирский суперкомпьютерный центр СО РАН" (Новосибирск) за предоставленную возможность использования вычислительных кластеров, на которых были проведены расчеты.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 20-43-543029, а также при финансовой поддержке базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН № АААА-А17-117020210021-7.

Статья не содержит экспериментов с привлечением животных или людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Bennett C.F. (2019) Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age. *Annu. Rev. Med.* **70**, 307–321.
- Smith C.I E., Zain R. (2019) Therapeutic oligonucleotides: State of the art. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 59, 605–630.
- Benizri S., Gissot A., Martin A., Vialet B., Grinstaff M.W., Barthélémy P. (2019) Bioconjugated oligonucleotides:

recent developments and therapeutic applications. *Bioconjug. Chem.* **30**, 366–383.

- Glazier D.A., Glazier D.A., Liao J., Roberts B.L., Li X., Yang K., Stevens C. M., Tang W., Tang W. (2020) Chemical synthesis and biological application of modified oligonucleotides. *Bioconjug. Chem.* 31, 1213–1233.
- Pyshnyi D.V., Lomzov A.A., Pyshnaya I.A., Ivanova E.M. (2006) Hybridization of the bridged oligonucleotides with DNA: thermodynamic and kinetic studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 23, 567–579.
- Banerjee D., Tateishi-Karimata H., Ohyama T., Ghosh S., Endoh T., Takahashi S., Sugimoto N. (2020) Improved nearest-neighbor parameters for the stability of RNA/DNA hybrids under a physiological condition. *Nucleic Acids Res.* 48(21), 12042–12054.
- Sugimoto N., Nakano S., Katoh M., Matsumura A., Nakamuta H., Ohmichi T., Yoneyama M., Sasaki M. (1995) Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry.* 34, 11211–11216.
- Hoshika S., Leal N. A., Kim M.-J., Kim M.-S., Karalkar N. B., Kim H.-J., Bates A. M., Watkins N.E., SantaLucia H.A., Meyer A.J., DasGupta S., Piccirilli J.A., Ellington A.D., SantaLucia J., Georgiadis M.M., Benner S.A. (2019) Hachimoji DNA and RNA: a genetic system with eight building blocks. *Science*. 363, 884– 887.
- 9. Watkins N.E., SantaLucia J. (2005) Nearest-neighbor thermodynamics of deoxyinosine pairs in DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6258–6267.
- McTigue P. M., Peterson R. J., Kahn J.D. (2004) Sequence-dependent thermodynamic parameters for locked nucleic acid (LNA)-DNA duplex formation. *Biochemistry.* 43, 5388–5405.
- Owczarzy R., You Y., Groth C.L., Tataurov A.V. (2011) Stability and mismatch discrimination of locked nucleic acid–DNA duplexes. *Biochemistry*. 50, 9352–9367.
- Lesnik E.A., Freier S.M. (1995) Relative thermodynamic stability of DNA, RNA, and DNA:RNA hybrid duplexes: relationship with base composition and structure. *Biochemistry.* 34, 10807–10815.
- Giesen U., Kleider W., Berding C., Geiger A., Ørum H., Nielsen P.E. (1998) A formula for thermal stability (*T(m)*) prediction of PNA/DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* 26, 5004–5006.
- von Ahsen N., Wittwer C.T., Schütz E. (2001) Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg²⁺, deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin. Chem.* 47, 1956–1961.
- Armacost K.A., Riniker S., Cournia Z. (2020) Novel directions in free energy methods and applications. *J. Chem. Inf. Model.* 60, 1–5.
- Kollman P.A., Massova I., Reyes C., Kuhn B., Huo S., Chong L., Lee M., Lee T., Duan Y., Wang W., Donini O., Cieplak P., Srinivasan J., Case D.A., Cheatham T.E. (2000) Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* 33, 889–897
- 17. Tsui V., Case D.A. (2000) Molecular dynamics simulations of nucleic acids with a generalized born solvation model. J. Am. Chem. Soc. **122**, 2489–2498.
- Rastelli G., Rio A.Del., Degliesposti G., Sgobba M. (2009) Fast and accurate predictions of binding free en-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

ergies using MM-PBSA and MM-GBSA. J. Comput. Chem. 32.

- Kumar S., Rosenberg J.M., Bouzida D., Swendsen R.H., Kollman P.A. (1992) The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. J. Comput. Chem. 13, 1011–1021.
- Lee T.-S., Radak B.K., Huang M., Wong K.-Y., York D.M. (2014) Roadmaps through free energy landscapes calculated using the multidimensional vFEP approach. *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 24–34.
- Williams-Noonan B.J., Yuriev E., Chalmers D.K. (2018) Free energy methods in drug design: prospects of "alchemical perturbation" in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* 61, 638–649.
- Sakuraba S., Asai K., Kameda T. (2015) Predicting RNA duplex dimerization free-energy changes upon mutations using molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. Lett.* 6, 4348–4351.
- 23. Lee H.-C., Hsu W.-C., Liu A.-L., Hsu C.-J., Sun Y.-C. (2014) Using thermodynamic integration MD simulation to compute relative protein—ligand binding free energy of a GSK3 β kinase inhibitor and its analogs. *J. Mol. Graph. Model.* **51**, 37–49.
- Wang E., Sun H., Wang J., Wang Z., Liu H., Zhang J.Z.H., Hou T. (2019) End-point binding free energy calculation with MM/PBSA and MM/GBSA: strategies and applications in drug design. *Chem. Rev.* 119, 9478– 9508.
- Gilson M.K., Honig B. (1988) Calculation of the total electrostatic energy of a macromolecular system: solvation energies, binding energies, and conformational analysis. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* 4, 7–18.
- Srinivasan J., Cheatham T.E., Cieplak P., Kollman P.A., Case D.A. (1998) Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate-DNA helices. J. Am. Chem. Soc. 120, 9401–9409.
- Brooks B.R., Janezic D., Karplus M. (1995) Harmonic analysis of large systems. I. Methodology. J. Comput. Chem. 16, 1522–1542
- Choudhary M.I., Shaikh M., Tul-Wahab A., Ur-Rahman A. (2020) *In silico* identification of potential inhibitors of key SARS-CoV-2 3CL hydrolase (Mpro) *via* molecular docking, MMGBSA predictive binding energy calculations, and molecular dynamics simulation. *PLoS One.* 15, e0235030.
- Wright D.W., Hall B.A., Kenway O.A., Jha S., Coveney P.V. (2014) Computing clinically relevant binding free energies of HIV-1 protease inhibitors. *J. Chem. Theory Comput.* 10, 1228–1241.
- 30. Lomzov A.A., Vorobjev Y.N., Pyshnyi D.V. (2015) Evaluation of the Gibbs free energy changes and melting temperatures of DNA/DNA duplexes using hybridization enthalpy calculated by molecular dynamics simulation. J. Phys. Chem. B. 119, 15221–15234.
- Yesudas J.P., Blinov N., Dew S.K., Kovalenko A. (2015) Calculation of binding free energy of short double stranded oligonucleotides using MM/3D-RISM-KH approach. J. Mol. Liq. 201, 68–76.
- 32. Golyshev V.M., Abramova T.V., Pyshnyi D.V., Lomzov A.A. (2019) Structure and hybridization properties of glycine morpholine oligomers in complexes with DNA and RNA: experimental and molecular dynamics studies. J. Phys. Chem. B. 123, 10571–10581.
- Golyshev V.M., Pyshnyi D.V., Lomzov A.A. (2021) Effects of phosphoryl guanidine modification of phos-

phate residues on the structure and hybridization of oligodeoxyribonucleotides. J. Phys. Chem. B. 125, 2841– 2855.

- 34. Suresh G., Priyakumar U.D. (2015) Inclusion of methoxy groups inverts the thermodynamic stabilities of DNA-RNA hybrid duplexes: a molecular dynamics simulation study. J. Mol. Graph. Model. 61, 150–159.
- 35. Siriwong K., Chuichay P., Saen-oon S., Suparpprom C., Vilaivan T., Hannongbua S. (2008) Insight into why pyrrolidinyl peptide nucleic acid binding to DNA is more stable than the DNA·DNA duplex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 765–771.
- Lomzov A.A., Gorelov V.V., Golyshev V.M., Abramova T.V., Pyshnyi D.V. (2015) 139 Analysis of structure and thermodynamics of modified DNA duplexes using molecular dynamics simulation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 33, 90–91.
- 37. Xia T., SantaLucia J., Burkard M.E., Kierzek R., Schroeder S. J., Jiao X., Cox C., Turner D.H. (1998) Thermodynamic parameters for an expanded nearestneighbor model for formation of RNA duplexes with Watson–Crick base pairs. *Biochemistry*. 37, 14719–14735.
- 38. Case D.A., Babin V., Berryman J.T., Betz R.M., Cai Q., Cerutti D.S., Cheatham T.E., Darden T.A., Duke R.E., Gohlke H., Goetz A.W., Gusarov S., Homeyer N., Janowski P., Kaus J., Kolossváry I., Kovalenko A., Lee T.S., LeGrand S., Luchko T., Luo R., Madej B., Merz K.M., Paesani F., Roe D.R., Roitberg A., Sagui C., Salomon-Ferrer R., Seabra G., Simmerling C.L., Smith W., Swails J., Walker R.C., Wang J., Wolf R.M., Wu X., Kollman P.A. (2014) AMBER 14, University of California, San Francisco. https://doi.org/10.13140/rg.2.2.17892.37766
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612.
- 40. Pérez A., Marchán I., Svozil D., Sponer J., Cheatham T.E., Laughton C.A., Orozco M. (2007) Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of α/γ conformers. *Biophys. J.* **92**, 3817–3829.
- Zgarbová M., Otyepka M., Šponer J., Mládek A., Banáš P., Cheatham T.E., Jurečka P. (2011) Refinement of the Cornell et al. nucleic acids force field based on reference quantum chemical calculations of glycosidic torsion profiles. *J. Chem. Theory Comput.* 7, 2886–2902.
- Lu X.-J. (2003) 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res.* 31, 5108–5121.
- 43. Lu X.-J., Olson W.K. (2008) 3DNA: a versatile, integrated software system for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures. *Nat. Protoc.* **3**, 1213–1227.
- 44. Gyi J.I., Conn G.L., Lane A.N., Brown T. (1996) Comparison of the thermodynamic stabilities and solution conformations of DNA•RNA hybrids containing purine-rich and pyrimidine-rich strands with DNA and RNA duplexes. *Biochemistry.* **35**, 12538–12548.
- Arnott S., Chandrasekaran R., Millane R.P., Park H.S. (1986) DNA-RNA hybrid secondary structures. J. Mol. Biol. 188, 631–640.
- 46. Hall K.B., McLaughlin L.W. (1991) Thermodynamic and structural properties of pentamer DNA-DNA,

RNA-RNA and DNA-RNA duplexes of identical sequence. *Biochemistry*. **30**, 10606–10613.

- Ломзов А.А., Купрюшкин М.С., Дюдеева Е.С., Пышный Д.В. (2021) Сравнительное исследование гибридизационных свойств фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов с ДНК и РНК. Биоорг. химия. 47(2), 250–258.
- Cross C.W., Rice J.S., Gao X. (1997) Solution structure of an RNA·DNA hybrid duplex containing a 3'-thioformacetal linker and an RNA A-tract. *Biochemistry.* 36, 4096–4107.
- 49. Zimmerman S.B., Pheiffer B.H. (1981) A RNA.DNA hybrid that can adopt two conformations: an X-ray diffraction study of poly(rA).poly(dT) in concentrated solution or in fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78**, 78–82.
- Zhou J., Gregurick S.K., Krueger S., Schwarz F.P. (2006) Conformational changes in single-strand DNA as a function of temperature by SANS. *Biophys. J.* 90, 544–551.
- Chen H., Meisburger S.P., Pabit S.A., Sutton J.L., Webb W.W., Pollack L. (2012) Ionic strength-dependent persistence lengths of single-stranded RNA and DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 799–804.
- Isaksson J., Acharya S., Barman J., Cheruku P., Chattopadhyaya J. (2004) Single-stranded adenine-rich DNA and RNA retain structural characteristics of their respective double-stranded conformations and show directional differences in stacking pattern. *Biochemistry.* 43, 15996–16010.

- 53. Chakraborty K., Mantha S., Bandyopadhyay S. (2013) Molecular dynamics simulation of a single-stranded DNA with heterogeneous distribution of nucleobases in aqueous medium. *J. Chem. Phys.* **139**(7), 075103.
- Sen S., Nilsson L. (2001) MD Simulations of homomorphous PNA, DNA, and RNA single strands: characterization and comparison of conformations and dynamics. J. Am. Chem. Soc. 123, 7414–7422.
- Owczarzy R., You Y., Moreira B.G., Manthey J.A., Huang L., Behlke M.A., Walder J.A. (2004) Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures. *Biochemistry*. 43, 3537–3554.
- SantaLucia J. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 1460–1465.
- 57. Nonin S., Leroy J.-L., Gueron M. (1995) Terminal base pairs of oligodeoxynucleotides: imino proton exchange and fraying. *Biochemistry*. **34**, 10652–10659.
- Smith L.G., Tan Z., Spasic A., Dutta D., Salas-Estrada L.A., Grossfield A., Mathews D.H. (2018) Chemically accurate relative folding stability of RNA hairpins from molecular simulations. *J. Chem. Theory Comput.* 14, 6598–6612.
- Shen L., Johnson T.L., Clugston S., Huang H., Butenhof K.J., Stanton R.V. (2011) Molecular dynamics simulation and binding energy calculation for estimation of oligonucleotide duplex thermostability in RNA-based therapeutics. J. Chem. Inf. Model. 51, 1957–1965.

CALCULATION OF RNA/RNA AND DNA/RNA DUPLEXES FORMATION ENERGY BASED ON MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION

V. M. Golyshev^{1, 2}, D. V. Pyshnyi^{1, 2}, and A. A. Lomzov^{1, 2, *}

¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia ²Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: lomzov@niboch.nsc.ru

The development of approaches for predictive calculation of hybridization properties of various nucleic acid derivatives (NA) is the basis for the rational design of constructs based on them. Modern advances in computer modeling methods indicate the possibility of such calculations. In this study, we have analyzed the possibility of calculating the energy of DNA/RNA and RNA/RNA duplexes using representative sets of complexes (65 and 75 complexes). We used the classical molecular dynamics (MD) method, the MMPBSA or MMGBSA approaches to calculate the enthalpy (ΔH°) component and the quasi-harmonic approximation (Q-Harm) or the normal vibration mode analysis (NMA) method to calculate the entropic (ΔS°) impact into

the Gibbs energy (ΔG_{37}°) of NA complexes formation. We found that using the MMGBSA method in the analysis of the MD trajectory of only the NA duplex and taking into account the empirical linear approximation, it is possible to calculate the enthalpy of formation of DNA, RNA, and hybrid duplexes of various length and GC-content with an accuracy of 8.6%. Within each type of complexes, the combination of rather efficient MMGBSA and Q-Harm approaches, applied to the trajectory of only the bimolecular complex, makes

it possible to calculate the ΔG_{37}° of duplex formation with a 10% error value. The information obtained during the data analysis indicate the possibility of extending the considered approach to analogs and derivatives of nucleic acids. In the future, this will give a fundamental opportunity to perform a rational design of new types of NA-directed sequence-specific compounds.

Keywords: thermal stability, hybridization, molecular dynamics, DNA/RNA, RNA/RNA, duplexes, molecular dynamics, MMGBSA, MMPBSA, oligonucleotides

———— БИОИНФОРМАТИКА ——

УДК 577.29:577.218

miRNA-16 КАК ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ В ИССЛЕДОВАНИЯХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР И МЕТА-АНАЛИЗ¹

© 2021 г. H. N. N. Thu^a, H. T. N. Vy^a, T. N. N. Thanh^a, D. T. N. Giang^a, T. N. Nhan^a, N. P. Hoang^a, T. N. Hue^{b, *}

^aVietnam National University, Ho Chi Minh City, 70000 Vietnam ^bDepartment of Physiology and Animal Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, 70000 Vietnam

> *e-mail: nthue@hcmus.edu.vn Поступила в редакцию 12.12.2020 г. После доработки 10.02.2021 г. Принята к публикации 24.02.2021 г.

Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) служит основным методом в количественном определении микроРНК. Обычно данные количественной ОТ-ПЦР нормализуют по референсным генам. Хотя микроРНК используют в диагностике и определении подтипов рака молочной железы (РМЖ), в различных исследованиях показано нарушение их регуляции при раке, из чего следует сделать вывод о некорректности использования микроРНК в качестве референсных генов. В обзоре проанализирован профиль экспрессии микроРНК miR-16 и предложены подходы к нормализации данных количественной ОТ-ПЦР при РМЖ. С использованием данных в выбранных рецензируемых работах определена разница в уровнях содержания miR-16 между пациентами с РМЖ и здоровыми людьми из контрольной группы, рассчитана стандартизированная разность средних (SMD) и применен тест χ^2 . Полученные значения: отрицательное для SMD (-0.56) и 62.62 (*p*-value = 0.05) для χ^2 – показатели дерегуляции экспрессии miR-16 подтвердила некорректность ее использования в качестве референсного гена при РМЖ. Комбинация miR-16 и miR-425 охарактеризована как более надежный эндогенный контроль.

Ключевые слова: рак молочной железы, miR-16, внутренний контроль, гены комбинированного контроля

DOI: 10.31857/S0026898421060136

введение

За последние несколько лет среди всех онкологических заболеваний рак молочной железы (РМЖ) занимает второе место как ведущая причина женской смертности. Показатель смертности женщин от РМЖ составляет примерно 1 : 38 (2.6%) [1]. Вероятность того, что у женщины будет диагностирован РМЖ, составляет 1 : 8 (13%), а каждая 39 женщина (3%) умирает от этого заболевания [2]. Несмотря на то, что за последние десятилетия общий процент женщин с РМЖ не изменился, среди афроамериканок, азиаток и женщин тихоокеанского региона этот показатель вырос [3]. Усовершенствование методов ранней диагностики РМЖ позволит оптимизировать стратегии лечения этого заболевания. Считается, что уровни определенных микроРНК могут быть использованы в качестве биомаркеров для ранней диагностике РМЖ.

История микроРНК началась в 1993 г., когда она была впервые обнаружена как часть группы регуляторных генов у *Caenorhabditis elegans* (см. обзор [4]). В дальнейших исследованиях показали, что первичные микроРНК транскрибируются с последовательностей ДНК в ядре, а затем процессируются в предшественники и зрелые микроРНК. Зрелые варианты микроРНК представляют собой короткие некодирующие одноцепочечные последовательности РНК, обычно длиной 19–23 нуклеотида. Выполняя регуляторную функцию, они связываются с РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) [5]. Связы-

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

Сокращения: РМЖ – рак молочной железы; SMD (Standard Mean Difference) – стандартизированная разница средних; I² (Inter-study heterogeneity) – неоднородность между исследованиями; SV (Stability Value) – значение стабильности; Cq (Quantitative Cycle) – пороговый цикл; 3'-UTR (3'-untranslated region) – 3'-нетранслируемая область.

ваясь с 3'-нетранслируемой областью (3'-UTR) определенных мРНК, комплекс вызывает либо ее деградацию мРНК, либо ингибирование трансляции. Одна микроРНК может привести к инактивации сотен генов. Они регулируют клеточную пролиферацию, дифференцировку, апоптоз и обмен глюкозы, холестерина и железа [4].

Поскольку микроРНК играют важную роль в нормальном развитии животных, нарушение их экспрессии "открывает окно" в патофизиологию многих заболеваний человека, в том числе онкологических [6]. В большинстве исследованных злокачественных опухолей обнаружено изменение профилей экспрессии микроРНК по сравнению теми же тканями здоровых людей, что позволяет считать микроРНК потенциальными биомаркерами для диагностики рака, прогноза течения и оптимизации схем лечения онкологических больных [6]. Так, первое сообщение о роли микроРНК в канцерогене относится к открытию потери гена miR-15a/16-1 при В-клеточном хроническом лейкозе [6].

Возможность использования микроРНК при изучении рака и, конечно РМЖ, зависит от надежности количественной оценки их экспрессии. Методы детекции микроРНК включают нозернблоттинг [7], проточную цитометрию с использованием гранул [8] и технологию микрочипов [9]. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) стала наиболее широко используемой технологией для количественной оценки микроРНК, благодаря высокой чувствительности, широкому динамическому диапазону и низким требованиям к матрице [10].

Независимо от используемого метода, нормализация данных - ключевой этап к получению точной и надежной количественной оценки уровня экспрессии генов [11]. Вариации, включая различия в количестве исходного образца, извлечении РНК, целостности РНК и эффективности синтеза кДНК, неизбежно возникают в ходе многостадийного процесса количественной ОТ-ПШР [11]. Использование внутренних референсных генов считается наиболее предпочтительным подходом к нормализации данных [12, 13]. Эти целевые последовательности должны иметь одинаковые вариации в процессе количественной оценки. Следовательно, успех количественного анализа определяется выбором адекватного контрольного гена [11].

miR-16 широко используют в качестве референсного гена в исследованиях рака, включая РМЖ. Однако экспрессия этой микроРНК нарушается при различных типах рака. В miR16 9-нуклеотидная якорная область нацелена на 3'-UTR различных генов, включая антиапоптотический белок BCL2. Кроме того, гены, вовлеченные в контроль перехода между G1/S-фазами клеточного цикла, такие как CCND1 (циклин D1), CCND3 (циклин D3), CCNE1 (циклин E1) и CDK6 (циклинзависимая киназа 6) [14, 15], и гены сигнального пути Wnt, например WNT3A [15], также служат мишенями miR-16. Следовательно, miR-16 регулирует клеточный цикл, стимулирует апоптоз клеток и подавляет их туморогенез [16].

Во многих исследованиях выявлена высокая стабильность уровня miR-16 при различных видах онкологических и других заболеваний, что позволяет рассматривать ее в качестве возможной референсной микроРНК. Однако miR-16 используется также и в качестве биомаркера для диагностики различных злокачественных опухолей человека. Следовательно, есть противоречие и его необходимо разрешить.

В обзоре на основании анализа опубликованных в научной литературе данных подробно рассмотрен профиль экспрессии miR-16 при РМЖ, оценена его пригодность для использования в качестве внутреннего контроля для нормализации результатов количественной ПЦР и предложен возможный подход к нормализации данных с использованием референсных генов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поиск публикаций. Поиск работ, опубликованных до 2020 года, проводили в базах данных PubMed, Embase и ScienceDirect с использованием следующих ключевых слов: "microRNA 16" OR "miRNA-16" OR "mir-16" OR "mir16" AND "expression" OR "reference gene" OR "control gene" OR "internal control" OR "housekeeping" OR "deregulation" OR "biomarker" AND "breast cancer" OR "breast neoplasm". Последний поиск проводили 11 апреля 2020 года.

Критерии включения и исключения. Исследования, включенные в мета-анализ, удовлетворяли следующим критериям: (1) оценка экспрессии miR-16 при PMЖ; (2) дизайн эксперимента по типу опыт-контроль; (3) описаны на английском языке; (4) наличие размера выборки и (AND) значения Сq или (OR) значения стабильности. Исследования исключали из анализа по следующим критериям: (1) обзорная статья, мета-анализ, реферат или материалы конференции; (2) дублированные публикации; (3) исследования на животных; (4) исследования без схемы опыт-контроль; оценка BIOCROSS меньше 7.

Сбор данных. Данные извлекали из каждого подходящего исследования и проверяли вручную. Затем для каждого подходящего исследования записывали следующие элементы: первый автор, год публикации, страна, этническая принадлежность, размер выборки и средний возраст субъектов в опытной и контрольной группах, тип злокачественной опухоли, источник контрольных образцов, значение Cq или показатели стабильности в случае опытной и контрольной групп.

Оценка качества. Контрольный список вопросов BIOCROSS применяли при оценке качества каждого исследования. включенного в мета-анализ. BIOCROSS – это метод выбора при проверке качества перекрестных исследований биомаркеров [17]. В связи с тем, что в анализ вошли также исследования по эндогенному контролю, ко всем видам перекрестных анализов применяли только первые семь пунктов опросника. Учитывали три "проблемы при рассмотрении" (IC). При наличии всех трех исследование получало оценку "2"; если одна или две проблемы не рассматривались, выставляли оценку "1", а при отсутствии упоминания каких-либо проблем — оценку "0". Таким образом, работа могла получить максимальную оценку 14 баллов.

Статистический анализ. Уровень экспрессии miR-16 в обозначениях Cq, стандартного отклонения и размера выборки получали и использовали при определении различий между пациентами с РМЖ (опытная группа) и без (контрольная группа). Модель случайных эффектов с обратной дисперсией применяли при определении стандартизированной разницы средних (SMD) и значения критерия χ^2 , а неоднородность между исследованиями выявляли с помощью статистики I². Все статистические анализы выполняли с использованием программного обеспечения RevMan v5.3 (The Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2014; Великобритания) и программного обеспечения Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристики отобранных исследований

Подходящие исследования отбирали по схеме, представленной на рис. 1. По заголовкам и аннотациям из различных источников данных обнаружили в общей сложности 350 статей. Далее исключили 296 статей, так как они не соответствовали критериям: 121 статья оказалась дубликатом, 65 статей рефератами, 2 статьи мета-анализом, 31 обзорными статьями, 9 статей были связаны с исследованием других заболеваний, в 47 статьях рассматривали другие микроРНК и еще в 21 статье исследование не проводилось по схеме опытконтроль. Оставшиеся 54 работы изучали детально, после чего еще 35 публикаций исключили, так как содержащихся в них данных было недостаточно. В итоге до финала "дошло" 19 работ [14, 15, 18-34].

miR-16 в качестве референсного гена в исследованиях РМЖ

miR-16 рекомендуется в качестве подходящего референсного гена в различных исследованиях РМЖ, так как экспрессия этой микроРНК стабильна и не различается между раковыми и нормальными клетками [14]. В общей сложности в 8 работах, рассмотренных в этом обзоре, использовали miR-16 в таком формате (табл. 1).

В исследовании Davoren и соавт. [14] 2008 года miR-16 идентифицирована как единственная наиболее стабильно экспрессируемая микроРНК – с М-значением GeNorm 1.191. miR-16 также выбрана из 15 наиболее стабильно экспрессируемых микроРНК в 40 типах нормальных тканей человека [14]. Более того, экспрессия miR-16 не различается в клетках первичной опухоли и ее метастазов [23]. Сообщалось, что уровень экспрессии и воспроизводимость его оценки для miR-16 стабильны в 226 образцах периферической крови [19]. В 2013 McDermott и др. [15] сравнили использование miR-16 в качестве эндогенного контроля с другими кандидатами, включая U6 – общий эндогенный контроль при РМЖ. Авторы выявили значительные колебания в уровнях содержания U6, в то время как содержание miR-16 оставалось относительно стабильным. Уровни большинства сывороточных микроРНК изменялись после многократного замораживания и оттаивания; в то время как miR-16 не изменялся [21]. В другом исследовании [22] для четырех РНК: miR-16, miR-223, miR-let-7а и RNU6B, – часто используемых в качестве контролей, определены уровни экспрессии в образцах РМЖ. Установлено, что let-7а и RNU6В не соответствуют критериям референсной РНК, тогда как для miR-16 обнаружен высокий уровень экспрессии и высокая стабильность.

В шести работах приведены значения стабильности (SV) miR-16 с использованием программного обеспечения NormFinder, которое позволяет напрямую оценивать систематическую ошибку, вносимую при использовании исследуемого гена при нормализации данных. Эта программа учитывает внутри- и межгрупповые различия и по полученному значению стабильности определяет наилучшее сочетание двух генов. Чем ниже SV, тем более стабилен паттерн экспрессии референсного гена. Хотя во всех этих работах получены небольшие значения SV для miR-16, необходимо было оценить вариативность данных. По результатам. полученным в шести выбранных исследованиях, построили график для определения среднего и стандартного отклонения SV miR-16 (рис. 2). Установлено, что различия по стандартному отклонению составили 0.479, что составляло 71% от среднего значения (0.6776). В каждом отдельном исследовании уровень miR-16 был стабилен, однако



Рис. 1. Блок-схема определения подходящих исследований для мета-анализа экспрессии miR-16 при РМЖ. В ходе поиска в базах данных и других источниках изначально обнаружили 350 статей. Затем в процессе отбора по различным критериям исключили 331 статью. В итоге мета-анализ выполнен на наборе из 19 статей.

при их сравнении для разных исследований различия были значительными.

Регуляция miR-16 нарушена при РМЖ

Изменение экспрессии miR-16 ясно наблюдали во многих исследованиях различных типов рака, а также в исследованиях неопухолевых заболеваний. РМЖ — одно из самых распространенных онкологических заболеваний с нарушенной регуляцией miR-16. В рассматриваемых далее восьми работах проанализированы связанные с раком паттерны экспрессии miR-16 (табл. 2).

В целом, уровень содержания miR-16 значительно повышен у пациентов с РМЖ по сравнению со здоровыми людьми. У пациентов с РМЖ, позитивным на рецепторы эстрогенов (ER⁺) и прогестерона (PR⁺), по сравнению с пациентами с ER⁻, PR⁻ и трижды негативным РМЖ (TNBC), уровни экзосомной miR-16 повышены [18]. На уровень miR-16 у пациентов с РМЖ влияют стадии заболевания. Так, у пациентов с инвазивной внутрипротоковой карциномой III стадии регистрировали повышенную экспрессию miR-16 [25]. Показано, что уровень этой микроРНК значительно увеличивается у пациентов, не имеющих метастазов, и снижается до нормального уровня при появлении метастазов в лимфатических узлах. В отличие от других проверенных микроРНК, химиотерапия не влияла на уровень miR-16 в плазме пациентов с РМЖ [30]. В одном из исследований, проведенном с использованием 30 образцов плазмы, показано, что уровень miR-16 не зависит от пола [27]. Интересно, что Н. Арраіаһ и др. [29] еще в 2011 году обнаружили значительное повышение содержания miR-16 в сыворотке реконвалесцентов, у которых ранее был диагностирован РМЖ, по сравнению со здоровыми индивидами. Повышенный уровень miR-16 наблюдали также у пациентов с активным метастатическим процессом [29]. Кроме того, показано нарушение регуляции miR-16 при TNBC. На основании этих данных можно говорить о возможной связи между низким уровнем miR-16 и опухолевой нагрузкой,



Рис. 2. Расчет среднего и стандартного отклонений по значениям SV для miR-16, полученным из 6 отобранных работ. Среднее значение и стандартное отклонение SV были рассчитаны и представлены на графике в виде числа над каждой полосой. Полоса "Всего" отображает среднее значение и стандартное отклонение "по всем исследованиям" (0.6776 ± 0.479).

что в перспективе можно использовать в качестве диагностического маркера TNBC. Также в плазме прооперированных пациентов в значительной степени восстанавливается уровень miR-16 [26]. Есть сообщения об изменении паттерна экспрессии miR-16 при РМЖ. Модель случайных эффектов с обратной дисперсией (с использованием значения Cq, стандартного отклонения и

IDa	Страца	Этническая	Раз выб	вмер орки	Сред возј	цний раст	Тип	Контроли	Экспрессия	Образец	Оценка
ID	Страна	лежность	опыт	конт- роль	опыт	конт- роль	рака	Контроль	miR-16	Образец	BIOCROSS
[14]	Ирландия	Европейская	31	5	N	A ^b	РМЖ	Здоровые ткани	Без отличий	Ткань	6
[15]	Ирландия	Европейская	50	30	56.17	49.65	РМЖ	Здоровые люди	Без отличий	Кровь	9
[19]	Ирландия	Европейская	83	63	55.1	52.1	РМЖ	Здоровые люди	Без отличий	Кровь	9
[20]	Америка	Европейская, Африкан- ская, Амери- канская	13	8	NA		РМЖ	Здоровые люди	Без отличий	Кровь	6
[21]	Китай	Азиатская	хая 30 20 56 53		53	РМЖ	Здоровые люди	Без отличий	Сыво- ротка	8	
[22]	Китай	Азиатская	21	30	41	55	РМЖ	Здоровые люди	Без отличий	Кровь	9
[23]	Австрия	Европейская	16	41	Один вн	нако- ый	Мета- стазы	Первичная опухоль	Без отличий	Ткань	6
[24]	Америка	Европейская	10	12	Один вн	нако- ый	РМЖ	Люди без опухолей	Без отличий	Плазма крови	6

Таблица 1. Основные характеристики работ, использующих MIR16 в качестве референсного гена при РМЖ

^а Идентификатор исследования (ссылка). ^b Не анализировали (здесь и далее).

		BIOCROSS	10	=	10	Ξ	6	10	Ξ	12
		Образец	Плазма крови	Кровь	Плазма крови	Ткань	Кровь	Сыворотка	Плазма крови	Плазма крови
	риотелно	miR-16	Повышена	Повышена	Снижена	Повышена	Повышена	Повышена	Повышена	Повышена
and a main of		Контроль	Здоровые люди	Здоровые люди	He-TNBC	Здоровые люди				
		Тип рака	РМЖ	РМЖ	TNBC ^b	ЖМЧ	ЖМЯ	РМЖ	РМЖ	РМЖ
	й возраст	контроль	59	NA	55.1	58	ΝA	53.26	63	51.04 + 12.80
	Средни	опыт	63	43	55.7	59	NA	46	56	54.00 + 10.30
unpedano (выборки	конт- роль	39	14	95	170	NA	15	46	96
toond time	Размер	OIIbIT	II	06	67	260	ΥN	29	111	84
troudo undav or	Этническая	принадлеж- ность	Европейская	Азиатская	Азиатская	Азиатская	Азиатская	Европейская	Европейская	Азиатская
		Страна	Германия	Пакистан	Китай	Китай	Китай	Америка	Германия	Китай
		IDa	[18]	[25]	[26]	[27]	[28]	[29]	[30]	[31]

Таблица 2. Основные характеристики работ, определяющих изменение содержания miR-16 при РМЖ

1050

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 <u>№</u> 6 размера выборки) использована при определении значения SMD и критерия χ^2 . SMD иногда используют как синоним термина "размер эффекта". Как правило, лекарственное средство сравнивают с плацебо или другим активным лекарственным препаратом. Нулевое значение SMD означает, что эффект нового препарата и плацебо эквивалентен. Если улучшение связано с более высокими баллами по определению исхода, SMD больше нуля указывает на степень эффективности лекарственного средства по сравнению с плацебо, a SMD меньше нуля указывает на степень, в которой лечение менее эффективно, чем плацебо [35]. Кроме того, критерий χ^2 применяется при проверке различий между классами в популяции. Если наблюдаемая статистика критерия χ^2 превышает критическое значение, нулевая гипотеза будет отклонена, что означает наличие различия между исследуемыми группами.

Среднее значение SMD -0.52 [-1.25, 0.22] означает, что существует значимая разница в уровнях экспрессии miR-16 между образцами пациентов с РМЖ и контрольными образцами здоровых людей. С точки зрения критерия χ^2 , полученное значение *F* составляет 62.62, что больше критического, равного 12.59 (степень свободы (DF) = 6, *p*-value = 0.05), а *p*-value – менее 0.00001 (табл. 3). Полученные данные подтверждают, что существует статистически значимая разница в уровне экспрессии miR-16 между пациентами с РМЖ и здоровыми людьми. Следовательно, при РМЖ, действительно, нарушена регуляция miR-16, а значит ее уровень нельзя использовать в качестве референсного при этом типе рака.

Поиск других возможных эндогенных контролей

Помимо дерегуляции miR-16 при РМЖ есть и другие факты, указывающие на то, что miR-16 не подходит в качестве референсного гена. Эритроциты — это неиссякаемый источник miR-16. Неосторожная экстракция ведет к их гемолизу. что приводит к искусственному повышению уровня miR-16 в плазме [36]. McDonald др. [37] сообщали о том, что уровень циркулирующей эндогенной miR-16 выше в образцах плазмы, чем в образцах сыворотки, из-за гемолиза, что приводит к увеличению величины Cq на 1-2 (т.е. соответствует увеличению числа копий в 2-4 раза). Это значит, что при использовании эндогенной miR-16 в качестве внутреннего контроля могут возникать ошибки при нормализации данных. Таким образом, эту микроРНК нельзя рассматривать в качестве идеального внутреннего контроля без строгого мониторинга гемолиза [34].

Shen и др. [32] исследовали возможность использования пяти микроРНК: miR-93, miR-103, miR-191, miR-423-3p и miR-425 – в качестве воз-

Таблица 3. Значения SMD и тест χ^2 по результатам выбранных исследований

Номер	Исследо- вание	Bec, %	SMD (95% CI)
1	[16]	15.4	-0.14 [-0.59, 0.32]
2	[18]	15.7	-0.53 [-0.90, -0.18]
3	[20]	13.2	0.16 [-0.72, 1.05]
4	[22]	14.9	0.33 [-0.23, 0.90]
5	[24]	13.5	-0.09 [-0.93, 0.75]
6	[25]	12.7	-3.92 [-4.90, -2.94]
7	[29]	14.5	0.15 [-0.45, 0.79]

можных референсных микроРНК при нормализации данных. Оказалось, что miR-93 экспрессируется наиболее стабильно и поэтому была выбрана в качестве референсной микроРНК. Ранее Stückrath и др. [30] показали, что экспрессия miR-16 аберрантна и поэтому в качестве референса для нормализации данных количественной ОТ-ПЦР выбрали miR-1207. Выбор был обусловлен тем, что для этой микроРНК был зарегистрирован стабильный уровень экспрессии с отсутствием различий между всеми сравниваемыми группами, а также наименьший коэффициент вариаций в популяциях. Однако в других исследованиях сообщалось о нарушение регуляции обеих микроРНК [18, 38]. Таким образом, выбор гена "домашнего хозяйства" для использования в качестве референсного при нормализации данных залача не из легких.

Необходим более точный подход при нормализации данных количественной ОТ-ПЦР. В целях повышения точности анализа предложено использовать комбинацию референсных генов (табл. 4). McDermott и др. [15] еще в 2013 году установили, что комбинация из двух микроРНК: miR-16 и miR-425 - в качестве эндогенного контроля дает более точные и надежные результаты, чем любые методы, использующие микроРНК или U6 по отдельности. Использование этого полхода позволило выявить паттерн дерегуляции целевых микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при раке и в контроле, в образцах крови человека [16]. miR-16 продолжают использовать в сочетании с другими микроРНК, как например в исследовании Davoren и др. [14], где на основании результатов NormFinder указали на let-7а и miR-16 как наиболее стабильную пару эндогенных контролей.

Raychaudhuri и др. [33] проанализировали возможные референсные гены в различных образцах первичного РМЖ и метастазов в лимфатические узлы, используя miR-16, let-7a, U48, U44 — как по-отдельности, так и в различных комбинациях пар микроРНК. Они установили, что комбина-

Таблиц	ta 4. Ochobe	ње характерист	гики и	сследов	заний, пс	иннэшкаэс	дне эзнэдо хю	огенных контј	ролей РМЖ			
1D ^a	Страна	Этническая поиналлеж-	Pa3 BbI60	мер орки	Средни	й возраст	Рак	Контроль	Референсная (Стабиль-	Облязец	Оценка
3		Ность	опыт	конт- роль	OIIbIT	конт- роль			miPHK	ность		BIOCROSS
[32]	Америка	Европейская	87	35		٧	РМЖ	Здоровые люди	miR-93	NA	Плазма Крови, моча, ткань	=
[30]	Германия	Европейская	111	46	56	63	РМЖ	Здоровые люди	miR-1207	NA	Плазма крови	=
[15]	Ирландия	Европейская	50	30	56.17	49.65	РМЖ	Здоровые люди	miR-16 + miR-425	0.184	Кровь	6
[14]	Ирландия	Европейская	31	5	~	٩	РМЖ	Здоровые люди	miR-16 + let-7a	0.221	Ткань	9
[33]	Германия	Европейская	16	16	~	٩	Первичный РМЖ	Метастазы в лимфоузлах	U48 + let-7a	0.21	Ткань	10
[31]	Китай	Азиатская	84	96	54.00 + +10.30	51.04 + + 12.80	РМЖ	Здоровые люди	miR-484 + miR-191	0.305	Плазма Крови	12
[34]	Китай	Азиатская	25	20	52	50.5	РМЖ	Здоровые люди	miR-103a + miR-132	0.44	Сыворотка	П
а Идент	гификатор ис	ледования (ссыл	IKa).									

1052

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

том 55 № 6

²⁰²¹



Рис. 3. Сравнение величины SV для miR-16 и для сочетаний референс-генов. Стабильность уровня miR-16 сравнивали со стабильностью уровней комбинированных контрольных генов по значению SV. Для miR-16 величина SV везде выше, а значит стабильность ниже, чем для комбинаций генов.

ция U48 и let-7а имеет самое низкое значение стабильности: SV = 0.21. В экспериментах Hu и соавт. [31] лучшей комбинацией в качестве эндогенного контроля при детекции сывороточной микроРНК, по крайней мере для наиболее распространенных видов рака, оказалась пара miR-484 и miR-191; а Zhang и соавт. [34] выявили самую высокую стабильность в комбинация miR-103a и miR-132.

Сравнение miR-16 и новых комбинаций контрольных генов проводили путем вычисления SV (рис. 3). Сочетание miR-16 с другими контрольными генами позволяет снизить SV. Например, SV для miR-16 и miR-425, рассчитанное Davoren и др. [14], составило 0.185, что на 85% ниже, чем для только miR-16. Сочетание miR-16 с let-7а также снижало SV до 0.221, или на 42% по сравнению с использованием только miR-16 [15]. В других исследованиях [31, 33] использовали другие комбинации, включая U48 и let 7a, miR-484 и miR-191, а также miR-103a и miR-132. Во всех случаях полученные значения SV были ниже, чем для одной miR-16.

Источники неоднородности результатов

Тест на неоднородность результатов использует статистику I^2 , которая количественно определяет величину дисперсии и показывает, в какой степени результаты исследований согласованы (диапазон от 0 до 100%). Разброс значений I^2 не зависит от размера выборки и от числа анализируемых при мета-анализе работ. Статистика I^2 описывает процент изменчивости при оценке эффекта, которая связана с неоднородностью, а не с ошибкой создания выборки [39]. Низкое значение *p* свидетельствует о неоднородности эффектов медицинского вмешательства. Чем выше значение I^2 , тем выше степень неоднородности результатов анализа. Как следует из данных, представленных в табл. 3, высокое значение I^2 (90%) указывает на высокую неоднородность результатов выполненного мета-анализа.

Исследования, включенные в обзор, различались по многим аспектам. Первая причина может быть связана с различиями в методах измерения уровня содержания miR-16. В большинстве исследований использовали образцы плазмы/сыворотки крови, а в других микроРНК выделяли из образцов тканей. Стадии РМЖ также могут быть источником неоднородности. Образцы получены на разных стадиях РМЖ, которые, как установлено ранее, имеют разные паттерны микроРНК. В большинстве работ отсутствует информация о предыстории лечении и времени последующего наблюдения. Результаты этих исследований были представлены различными способами. В некоторых работах приведены значения C_t и стандартного отклонения (SD), а в других использована кратность изменений или результаты представлены в терминах квартильного диапазона, что усложняет вычисление C_t в ходе мета-анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании дано общее представление о характере экспрессии miR-16 и проанализирована возможность использовать эту микроРНК в качестве эндогенного контроля при РМЖ. Хотя в различных исследованиях miR-16 использована для нормализации данных количественной ОТ-ПЦР, выяснилось, что при РМЖ ее экспрессия нарушается. Кроме того, поскольку miR-16, скорее всего, высвобождается из эритроцитов посредством гемолиза, уровни ее содержания в плазме могут быть искусственно завышены во время выделения. Объединение нескольких микроРНК на одной панели может стать полезным инструментом в таких экспериментах – как например, комбинация miR-16 и miR-425, которую использовали Mcdermott и соавт. [15]. Точность этого комбинированного эндогенного контроля показана впоследствии в исследованиях других авторов. Задача найти идеальный ген "домашнего хозяйства" в качестве внутреннего контроля может быть нерешаемой, однако стратегия комбинированного эндогенного контроля позволяет повысить точность анализа количественной ОТ-ППР при лиагностике РМЖ.

Авторы выражают благодарность Oncology Hospital HCMC за участие в сборе данных.

Исследование выполнено при поддержке Vietnam National University, Ho Chi Minh City (VNU-HCM; grant No. 562-2020-18-02).

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. American Cancer Society. (2020) How common is breast cancer? https://www.cancer.org/cancer/breastcancer/about/how-common-is-breast-cancer.html
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019) Basic information about breast cancer. https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/index.htm
- O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. (2018) Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol.* 9, 402. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402
- MacFarlane L.A., Murphy P.R. (2010) MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Curr. Genomics*. 11(7), 537–561. https://doi.org/10.2174/138920210793175895
- Tan W., Liu B., Qu S., Liang G., Luo W., Gong C. (2018) MicroRNAs and cancer: key paradigms in molecular therapy. *Oncol. Lett.* 15(3), 2735–2742. https://doi.org/10.3892/ol.2017.7638
- Lu J., Getz G., Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B.L., Mak R.H., Ferrando A.A., Downing J.R., Jacks T.,

Horvitz H.R., Golub T.R. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. **435**(7043), 834–838.

https://doi.org/10.1038/nature03702

7. Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Townsend M., Yoshii A., Šestan N., Rakic P., Constantine-Paton M., Horvitz H.R. (2004) Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol.* **5**(9), R68.

https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-9-r68

 Chen C. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33(20), e179– e179. https://doi.org/10.1093/nar/gni178

9. Li W., Ruan K. (2009) MicroRNA detection by mi-

- croarray. Anal. Bioanal. Chem. **394**(4), 1117–1124. https://doi.org/10.1007/s00216-008-2570-2
- Bustin S. (2002) Quantification of mRNA using realtime reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29(1), 23–39. https://doi.org/10.1677/jme.0.0290023
- Nolan T., Hands R.E., Bustin S.A. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 1(3), 1559–1582. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236
- Aqeilan R.I., Calin G.A., Croce C.M. (2010) miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ*. **17**(2), 215–220. https://doi.org/10.1038/cdd.2009.69
- Linsley P.S., Schelter J., Burchard J., Kibukawa M., Martin M.M., Bartz S.R., Johnson J.M., Cummins J.M., Raymond C.K., Dai H.Y., Chau N., Cleary M., Jackson A.L., Carleton M., Lim L. (2007) Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* 27(6), 2240– 2252.

https://doi.org/10.1128/MCB.02005-06

- Davoren P.A., McNeill R.E., Lowery A.J., Kerin M.J., Miller N. (2008) Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol. Biol.* 9(1), 76. https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-76
- McDermott A.M., Kerin M.J., Miller N. (2013) Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. *PLoS One.* 8(12), e83718. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083718
- Liu Q., Fu H., Sun F., Zhang H., Tie Y., Zhu J., Xing R., Sun Z., Zhenget X. (2008) miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* 36(16), 5391.
- Wirsching J., Graßmann S., Eichelmann F., Harms L.M., Schenk M., Barth E., Berndzen A., Olalekan M., Sarmini L., Zubere H., Aleksandrova K. (2018) Development and reliability assessment of a new quality appraisal tool for cross-sectional studies using biomarker data (BIOCROSS). *BMC Med. Res. Methodol.* 18(1), 122.

https://doi.org/10.1186/s12874-018-0583-x

 Ni Q., Stevic I., Pan C., Müller V., Oliveira-Ferrer L., Pantel K., Schwarzenbach H. (2018) Different signa-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

tures of miR-16, miR-30b and miR-93 in exosomes from breast cancer and DCIS patients. *Sci. Rep.* **8**(1), 12974.

https://doi.org/10.1038/s41598-018-31108-y

- Heneghan H.M., Miller N., Kelly R., Newell J., Kerin M.J. (2010) Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist.* 15(7), 673–682. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0103
- Zhu W., Qin W., Atasoy U., Sauter E.R. (2009) Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res. Notes.* 2(1), 89. https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-89
- Xiang M., Zeng Y., Yang R., Xu H., Chen Z., Zhong J., Xie H., Xu Y., Zeng X. (2014) U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 454(1), 210–214.

https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.064

- Hu J., Wang Z., Liao B.Y., Yu L., Gao X., Lu S., Wang S., Dai Z., Zhang X., Chen Q., Qiu S.-J., Wu Y., Zhu H., Fan J., Zhou J., Wang J. (2014) Human miR-1228 as a stable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs in cancer patients: miR-1228 as a control for quantifying circulating miRNAs. *Int. J. Cancer.* 135(5), 1187–1194. https://doi.org/10.1002/ijc.28757
- Rinnerthaler G., Hackl H., Gampenrieder S., Hamacher F., Hufnagl C., Hauser-Kronberger C., Zehentmayr F., Fastner G., Sedlmayer F., Mlineritsch B., Greil R. (2016) miR-16-5p is a stably-expressed housekeeping microRNA in breast cancer tissues from primary tumors and from metastatic sites. *Int. J. Mol. Sci.*

17(2), 156.

https://doi.org/10.3390/ijms17020156

- Rice J., Roberts H., Rai S.N., Galandiuk S. (2015) Housekeeping genes for studies of plasma microRNA: a need for more precise standardization. *Surgery*. 158(5), 1345–1351. https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.04.025
- Usmani A., Shoro A.A., Shirazi B., Memon Z., Hussain M. (2017) miR-16: a novel hereditary marker in breast cancer and their offspring. *J. Pak. Med. Assoc.* 67(3), 5.
- Shin V.Y., Siu J.M., Cheuk I., Ng E.K.O., Kwong A. (2015) Circulating cell-free miRNAs as biomarker for triple-negative breast cancer. *Br. J. Cancer.* 112(11), 1751–1759.

https://doi.org/10.1038/bjc.2015.143

- 27. Ng E.K.O., Li R., Shin V.Y., Jin H.C., Leung C.P.H., Ma E.S.K., Pang R., Chua D., Chu K.-M., Law W.L., Law S.Y.K., Poon R.T.P., Kwong A. (2013) Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *PLoS One.* 8(1), e53141. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053141
- Zhao Q., Deng S., Wang G., Liu C., Meng L., Qiao S., Shen L., Zhang Y., Lü J., Li W., Zhang Y., Wang M., Pestell R.G., Liang C., Yu Z. (2016) A direct quantification method for measuring plasma microRNAs identified potential biomarkers for detecting metastatic

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 6 2021

breast cancer. *Oncotarget*. 7(16), 21865–21874. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7990

 Appaiah H.N., Goswami C.P., Mina L.A., Badve S., Sledge G.W., Liu Y., Nakshatri H. (2011) Persistent upregulation of U6:SNORD44 small RNA ratio in the serum of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 13(5), R86.

https://doi.org/10.1186/bcr2943

- Stückrath I., Rack B., Janni W., Jäger B., Pantel K., Schwarzenbach H. (2015) Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. *Oncotarget.* 6(15), 13387.
- Hu Z., Dong J., Wang L.E., Ma H., Liu J., Zhao Y., Tang J., Chen X., Dai J., Wei Q., Zhang C., Shen H. (2012) Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*. 33(4), 828–834. https://doi.org/10.1093/carcin/bgs030
- 32. Shen J., Hu Q., Schrauder M., Yan L., Wang D., Medico L., Medico L., Guo Y., Yao S., Zhu Q., Liu B., Qin M., Beckmann M.W., Fasching P.A., Strick R., Johnson C.S., Ambrosone C.B., Zhao H., Liu S. (2014) Circulating miR-148b and miR-133a as biomarkers for breast cancer detection. *Oncotarget*. 5(14), 5284–5294. https://doi.org/10.18632/oncotarget.2014
- Raychaudhuri M., Schuster T., Buchner T., Malinowsky K., Bronger H., Schwarz-Boeger U., Höfler H., Avril S. (2012) Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer. J. Mol. Diagn. 14(4), 376– 384.

https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.01.016

- 34. Zhang L., Xu Y., Jin X., Wang Z., Wu Y., Zhao D., Chen G., Li D., Wang X., Cao H., Xie Y., Liang Z. (2015) A circulating miRNA signature as a diagnostic biomarker for non-invasive early detection of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **154**(2), 423–434. https://doi.org/10.1007/s10549-015-3591-0
- 35. Faraone S.V. (2008) Interpreting estimates of treatment effects: implications for managed care. *Pharm. Ther.* **33**(12), 700.
- Leidner R.S., Li L., Thompson C.L. (2013) Dampening enthusiasm for circulating microRNA in breast cancer. *PLoS One*. 8(3), e57841. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057841
- McDonald J.S., Milosevic D., Reddi H.V., Grebe S.K., Algeciras-Schimnich A. (2011) Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin. Chem.* 57 (6), 833–840. https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.157198
- Hamam R., Hamam D., Alsaleh K., Kassem M., Zaher W., Alfayez M., Aldahmash A., Alajez N.M. (2017) Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis.* 8(9), e3045.

https://doi.org/10.1038/cddis.2017.440

 Higgins J.P., Thompson S.G. (2002) Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat. Med.* 21(11), 1539– 1558.

ТНU и др.

miRNA-16 AS AN INTERNAL CONTROL IN BREAST CANCER STUDIES: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

H. N. N. Thu¹, H. T. N. Vy¹, T. N. N. Thanh², D. T. N. Giang¹, T. N. Nhan¹, N. P. Hoang¹, and T. N. Hue^{2, *}

¹Vietnam National University, Ho Chi Minh City, 70000 Vietnam

²Department of Physiology and Animal Biotechnology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, 70000 Vietnam

110 Chi Minh Cuy, 70000 Vieinul

*e-mail: nthue@hcmus.edu.vn

Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) is a method of choice for quantifying micro RNAs (miRNAs). Typically, RT-qPCR data are normalized to reference genes. While miRNAs are used for diagnosing and subtyping breast cancer, various studies show their deregulation in this condition, thus, undermining miRNAs' utility as a reference. This review examines the expression pattern of miR-16 and suggests normalization approaches for breast cancer. We analyzed the data from selected peer-reviewed studies to calculate the standardized mean difference (SMD) with subsequent Chi-square testing and identified the difference in miR-16 expression between breast cancer patients and healthy controls. With a negative SMD value of -0.56 and Chi-square of 62.62 (*p*-value = 0.05), the deregulation of miR-16 in breast cancer was confirmed. High variance in the stability value (SV) of miR-16 expression levels confirmed its inappropriateness as a control gene in breast cancer. The combination of miR-16 and miR-425 was confirmed as an accurate endogenous control.

Keywords: breast cancer, miR-16, internal control, combined control genes