СОДЕРЖАНИЕ

_

_

Том 55, номер 1, 2021

-

ОБЗОРЫ	
Эволюционные аспекты геномного импринтинга	
Е. А. Саженова, И. Н. Лебедев	3
Особенности регуляции синтеза рибосомных белков у прокариот	
А. О. Михайлина, Е. Ю. Никонова, О. С. Костарева, С. В. Тищенко	20
Причины и последствия геномной нестабильности при психических и нейродегенеративных заболеваниях	
И. Ю. Юров, С. Г. Ворсанова, О. С. Куринная, М. А. Зеленова, К. С. Васин, Ю. Б. Юров	42
ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА	
Отделы центральной нервной системы мыши отличаются по количеству транскриптов протеасомных генов	
С. Ю. Фуников, Д. С. Спасская, А. В. Буров, Е. В. Тетерина, А. А. Устюгов, В. Л. Карпов, А. В. Морозов	54
Экспрессия генов транспортеров ABCA1 и ABCG1 и факторов транскрипции PPARγ, LXRβ и RORα в подкожной и висцеральной жировой ткани у женщин с метаболическим синдромом	
А. А. Пантелеева, Н. Д. Разгильдина, Д. Л. Бровин, И. А. Побожева, К. В. Драчева, О. А. Беркович, Е. А. Полякова, О. Д. Беляева, Е. И. Баранова, С. Н. Пчелина, В. В. Мирошникова	64
Молекулярный полиморфизм генов β-галактозидазы <i>LAC4</i> у молочных и природных штаммов дрожжей <i>Kluyveromyces</i>	
Л. В. Лютова, Г. И. Наумов, А. В. Шнырева, Е. С. Наумова	75
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ	
Уровень sgPHK как основной фактор, влияющий на эффективность CRISPRi нокдауна в клеточной линии K562	
Y. Wang, Y. Xie, Z. C. Dong, X. J. Jiang, P. Gong, J. Lu, F. Wan	86
Бетасателлит курчавости листьев хлопка мультана как инструмент для изучения локализации геминивирусов в растениях	
Z. Iqbal, M. N. Sattar, M. Khurshid	96
Роль транскрипционных факторов SP1 и FOXA1 в регуляции экспрессии гена <i>IL33</i> в клетках рака молочной железы и рака легкого	
А. М. Горбачева, Д. В. Купраш, Н. А. Митькин	107
Рецептор фактора роста сосудистого эндотелия типа II (VEGFR2) вносит вклад в формирование резистентности эстрогенположительного рака молочной железы к тамоксифену	
Т. А. Дронова, Н. Н. Бабышкина, М. В. Завьялова, Е. М. Слонимская, Н. В. Чердынцева	118
Обработка стромальных слоев митомицином С стимулирует поддержание кроветворения в системе сокультивирования <i>in vitro</i>	
О. Ф. Кандараков, Ю. В. Кравацкий, Н. С. Полякова, А. В. Брутер, Е. Г. Гордеева, А. В. Белявский	126

Изменение экспрессии гена CASC5 коррелирует с таргетными мутациями при лейкозе

К. В. Богданов, О. В. Мерзликина, Ю. В. Миролюбова,

Л. Л. Гиршова, Э. Г. Ломаиа, А. Ю. Зарицкий

Сравнительный анализ нейротоксического эффекта МФТП у мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина

К. Д. Чапров, Е. В. Тетерина, А. Ю. Роман, Т. А. Иванова, В. В. Голоборщева,

В. Г. Кучеряну, С. Г. Морозов, Е. А. Лысикова, О. А. Лыткина, И. В. Королева,

Н. Я. Попова, А. И. Антохин, Р. К. Овчинников, М. С. Кухарский

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Гликолевые и фосфатные депо-формы 4- и/или 5-модифицированных нуклеозидов, проявляющих противобактериальную активность

С. Д. Негря, М. В. Ясько, Д. А. Макаров, П. Н. Сольев, И. Л. Карпенко,

- О. В. Шевченко, О. В. Чехов, А. А. Глухова, Б. Ф. Васильева,
- Т. А. Ефименко, И. Г. Сумарукова, О. В. Ефременкова,

С. Н. Кочетков, Л. А. Александрова

139

152

——— ОБЗОРЫ ——

УДК 577.218

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА

© 2021 г. Е. А. Саженова^{а, *}, И. Н. Лебедев^а

^аНаучно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

*e-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru Поступила в редакцию 12.04.2020 г. После доработки 12.04.2020 г. Принята к публикации 25.05.2020 г.

Геномный импринтинг — эпигенетический феномен, дифференциально маркирующий материнские и отцовские копии генов в геноме и обеспечивающий их моноаллельную экспрессию в зависимости от родительского происхождения. Импринтинг является эволюционной головоломкой, поскольку несет издержки диплоидизации, отказываясь от ее преимуществ в виде защиты от рецессивных мутаций. Целью настоящего обзора был поиск ответа на вопрос о причинах возникновения геномного импринтинга и его закрепления в эволюции цветковых растений, насекомых, сумчатых и плацентарных млекопитающих.

Ключевые слова: геномный импринтинг, эукариоты, эволюция, метилирование ДНК, плацента, головной мозг

DOI: 10.31857/S0026898420060105

введение

Геном большинства многоклеточных организмов диплоиден. Это позволяет соматическим клеткам иметь две родительские копии генов и дает потенциальную возможность отцовским и материнским локусам быть в равной степени активными в геноме потомка. Геномный импринтинг, демонстрируя функциональную неэквивалентность аллелей, активность которых зависит от их родительского происхождения, представляет яркое исключение из этого правила. Появление импринтинга в эволюции ставит вопрос о том, почему у диплоидного организма развивается процесс подавления экспрессии некоторых генов на одной из гомологичных хромосом и тем самым происходит возврат к функциональной, эпигенетической, но не структурной гаплоидизации этих аллелей.

Геномный импринтинг известен у филогенетически удаленных таксонов — некоторых насекомых и высших растений, а также у сумчатых и плацентарных млекопитающих, включая человека. Термин "импринтинг" (от англ. imprint — отпечаток) в генетическом контексте впервые применила в 1960 г. Н. Сгоизе для описания селективной элиминации отцовской половой хромосомы при дроблении зиготы у мужских особей листовых, или почвенных комариков *Sciara* [1, 2].

Моноаллельная экспрессия гена обычно невыгодна для диплоидных организмов, поскольку рецессивные мутации не могут компенсироваться функциональным гомологичным локусом. В то же время подавление активности одного из аллелей и стоящая за этим, как правило, гетерохроматинизация участка хромосомы, инактивирует такие потенциально опасные элементы в геноме, как транспозоны и чужеродные последовательности ДНК.

Экспрессия импринтированных генов у растений происходит главным образом в эндосперме и затрагивает более 100 генов, ответственных за развитие и питание зародыша [3]. Геномы млекопитающих также содержат некоторое количество импринтированных генов - от четырех у сумчатого опоссума до более 100 у мыши и человека. при этом примерно 50% импринтированных генов кодируют факторы, вовлеченные в эмбриональное и неонатальное развитие, 20% – связаны с неврологическими процессами, а остальные не связаны с какой-либо очевидной биологической функцией [4]. Таким образом, геномный импринтинг закрепился в двух основных направлениях — в регуляции эмбрионального и неонатального роста и в развитии головного мозга у млекопитающих.

В настоящем обзоре мы попытаемся ответить на вопрос, с какой целью геномный импринтинг возник и закрепился в эволюции у далеко отстоящих таксонов, таких как цветковые растения, насекомые, сумчатые и плацентарные млекопитающие, а также рассмотрим мишени, на которые в первую очередь воздействует импринтинг, обсудим гипотезы о роли импринтинга в эволюции.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА У РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

Метилирование ДНК и гистонов, играющее определяющую роль в регуляции геномного импринтинга, удивительно похоже у млекопитающих и покрытосеменных растений. Сходство рисунков метилирования у арабидопсиса, кукурузы и риса предполагает, что регуляция экспрессии импринтированных генов сохранилась на протяжении 150 млн лет эволюции. У растений метилированию подвергаются три мотива геномной ДНК: СрG, СрНрG и СрНрН (где Н – любой нуклеотид, кроме G). В этом процессе участвуют белки МЕТ, СМТ и DRM. Гены МЕТ1, МЕТ2 и МЕТЗ, кодирующие ДНК-метилтрансферазы, специфичны только для растений и поддерживают метилирование ДНК в сайтах СрG, при этом *MET1* является ортологом гена DNMT1 поддерживающей ДНК-метилтрансферазы млекопитающих. MET1 взаимодействует с белками VIM, содержащими SET- и RING-ассоциированные домены, для поддержания симметричного метилирования СрG после репликации ДНК [5]. Хромометилаза СМТ3 поддерживает метилирование преимущественно в сайтах СрНрG. Мутанты по гену СМТЗ арабидопсиса характеризуются гипометилированием в указанных сайтах и повышенной транскрипцией ретротранспозонов, однако фенотипически не отличаются от растений дикого типа [6]. Представители метилтрансфераз DRM (Domains Rearranged Methyl-Transferase) гомологичны ДНК-метилтрансферазе DNMT3 животных, но имеют иную очередность каталитических доменов [7]. Ключевой белок этого семейства -ДНК-метилтрансфераза 2 (DRM2), метилирует цитозин de novo во всех трех возможных сайтах посредством РНК-направляемого метилирования ДНК (RdDM), опосредованного РНК-полимеразой IV (Pol IV), которая индуцирует малые интерферирующие РНК (siPHK). Растения, мутантные по гену DRM2, жизнеспособны и не имеют внешних отличий от растений дикого типа. Показано, что путь RdDM участвует в регуляции импринтинга у Arabidopsis thaliana [8]. Некодирующие малые РНК выполняют важные функции в процессах роста и развития как млекопитающих, так и растений.

У млекопитающих метилирование затрагивает главным образом динуклеотиды CpG, тогда как метилирование CpHpG и асимметричных последовательностей CpHpH в большинстве клеток наблюдается редко. При этом DNMT3 инициирует метилирование *de novo*, а DNMT1 поддерживает метилирование цитозина в CpG-сайтах в ходе репликации ДНК. У растений количественно преобладает метилирование динуклеотидов СрG, однако и другие последовательности метилируются довольно часто. В частности, в геноме *A. thaliana* метилированием затронуто около 24% сайтов СрG, 7% СрНрG и лишь 1.7% СрНрН [9, 10]. У гексаплоидной пшеницы примерно 30% всего метилирования приходится на сайты СрНрG. В противоположность этому гипометилирование катализируется ДНК-гликозилазой DEMETER (DME), которая может вырезать метилированный цитозин из ДНК. Этот процесс происходит в центральной женской клетке до слияния со спермием [11].

Метилированное состояние необходимо для подавления экспрессии отцовских аллелей импринтированных генов в эндосперме. У высших растений при гаметогенезе уровень метилирования ДНК в центральном ядре зародышевого мешка оказывается ниже, чем в мужских гаметах пыльцевого зерна. В большинстве случаев в эндосперме активны материнские гипометилированные аллели, в то время как аллели, полученные из спермия, оказываются гиперметилированными и неактивными. Избирательная активация материнских аллелей генов, подвергающихся импринтингу, включает поэтапное деметилирование ДНК в эндосперме путем избирательной репрессии гена *MET1* перед последним синцитиальным делением в центральной клетке женского гаметофита и последующую активацию DME на ранних этапах развития эндосперма [12]. Комплекс PRC2 (Polycomb repressive complex 2), консервативный у млекопитающих и растений, вовлечен в подавление экспрессии генов. У цветковых растений импринтированные гены FIS2 и MEDEA (MEA) кодируют субъединицы этого комплекса, обеспечивающего триметилирование гистона НЗ по Lys27 (H3K27me3), регулирующего активность импринтированных генов в эндосперме. Н3К27те3 – единственная известная модификация гистонов, которая коррелирует с импринтингом у цветковых растений [3]. Мутация PRC2 нарушает импринтированную экспрессию многих генов, большинство из которых активны на отцовском гомологе. Нарушение экспрессии одного из этих генов приводит к потере импринтинга, свидетельствуя о том, что метилирование ДНК первично для распознавания PRC2 и установления импринтинга. В соответствии с этим активность PRC2 обычно коррелирует с метилированием ДНК, в том числе в эндосперме A. thaliana, где PRC2 направлен на транспозоны, ассоциированные с DME-опосредованным деметилированием [8].

Отсутствие экспрессии деметилазы DME влияет на нормальную экспрессию генов *MEDEA* и *FIS2*, что приводит к аномальному развитию эндосперма [13]. Нарушения статуса метилирования импринтированных генов у некоторых мутантов или под действием химических агентов вызывают существенные изменения в развитии и морфологии растений. У растений с гомозиготными мутациями, вызывающими глобальное гипометилирование ДНК, при самоопылении происходит прогрессивное накопление фенотипических аномалий в ряду поколений. Причиной этого является эктопическая экспрессия всех новых генов в результате их случайного гипометилирования.

У высших растений импринтированный ген с отцовской экспрессией PHERES1 (PHE1) кодирует фактор транскрипции и способствует росту зародыша [14]. Экспрессия данного гена на материнском гомологе подавляется гистон-метилтрансферазой HEAK27me3 MEDEA, которая ограничивает рост A. thaliana. Специфическое включение определенного варианта гистона H3 в сперматозоидах A. thaliапа может подавлять отцовский аллель в эндосперме или зиготе. Например, мутации в экспрессирующемся по материнской линии гене MEDEA приводят к образованию абортированных семян даже в присутствии унаследованной функциональной отцовской копии [15]. Таким образом, появление геномного импринтинга в эволюции цветковых растений предполагает возможность его связи с возникновением новых репродуктивных стратегий в развитии и питании зародыша [16].

В геноме человека из более 20 тысяч генов импринтированы около 100 [17]. В основном это гены, кодирующие белки, большинство из которых сгруппированы в кластеры под общим внутренним регуляторным контролем центров импринтинга. В каждом из таких кластеров центры импринтинга в *cis*-положении инициируют выключение транскрипции импринтированных генов через продукцию нетранслируемой РНК, а последующее метилирование ДНК закрепляет это состояние. Импринтированные гены влияют на рост эндосперма и размер семян у цветковых -*А. thaliana* и сельскохозяйственных растений. Точное количество этих генов на сеголняшний день не определено, неясно и сушествование кластерной организации импринтированных генов под единым *cis*-контролем в геноме [18].

"ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ" ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА В ОНТОГЕНЕЗЕ

Растения. В период цветения из диплоидных клеток растений формируются микро- и мегаспороцисты (2n), которые претерпевают мейоз и образуют гаплоидную фазу развития — микро- и мегаспору (n) (рис. 1). Затем микроспора проходит два митотических деления, в результате чего образуется микрогаметофит, или пыльцевое зерно, содержащее вегетативную клетку (n) и две мужские гаметы (n, n). Гаплоидная мегаспора в результате трех последовательных митотических делений образует мегагаметофит (эмбриональный

мешок), содержащий восемь гаплоидных клеток, две из которых формируют центральную клетку. В результате мегагаметафит имеет две женские гаметы – центральную клетку (2n) и яйцеклетку (n), а в дополнение к ним клетки-синергиды, которые участвуют в процессе оплодотворения. При оплодотворении пыльцевое зерно попадает на рыльце пестика, вегетативная клетка прорастает в виде пыльцевой трубки и доставляет два сперматозоида в зародышевый мешок. Один сперматозоид оплодотворяет гаплоидную яйцеклетку, а другой соединяется с двумя полярными ядрами центральной клетки эмбрионального мешка. Оплодотворенная центральная клетка впоследствии развивается в триплоидный эндосперм (3n), а оплодотворенная яйцеклетка образует диплоидный зародыш (2n). Этот процесс известен как двойное оплодотворение, описанное впервые Сергеем Гавриловичем Навашиным в 1898 году.

При прорастании семени эпигенетические метки геномного импринтинга у эмбриона стираются и остаются только в эндосперме, который необходим для роста и питания зародыша и не участвует в формировании следующего поколения (рис. 1). Очевидно, что родительский импринтинг должен быть установлен во время развития гаметофита и регулировать экспрессию аллельных генов в ходе раннего развития эмбриона и эндосперма. И действительно, геномный импринтинг вновь восстанавливается в период микро- и мегаспорогенеза, на стадии формирования пыльцевого зерна и 7-ядерного зародышевого мешка, во время двух митотических делений при развитии пыльцевого зерна и трех последовательных митотических делений в период формировании восьмиядерного гаплоидного мегагаметофита [8].

Животные (млекопитающие). В онтогенезе млекопитающих в зародышевых примордиальных половых клетках происходит практически полное деметилирование ДНК (рис. 2). В результате такого события как импринтированные, так и неимпринтированные гены становятся гипометилированными. Тем не менее, ДНК не подвергается полному деметилированию, и средний индекс метилирования в мужских и женских примордиальных половых клетках остается на уровне 7.8 и 6.0% соответственно. В зрелых гаметах происходит de novo метилирование и установление рисунка метилирования в импринтированных генах согласно полу родителя. В то же время примерно 10% СрGдинуклеотидов остаются неметилированными [19]. Другая волна эпигенетического репрограммирования генома происходит сразу же после оплодотворения. В это время материнский и отцовский геном подвергаются деметилированию, за исключением импринтированных генов. Материнский геном пассивно деметилируется в течение нескольких клеточных делений. Деметилирование мужского генома происходит активно во



Рис. 1. "Жизненный цикл" геномного импринтинга у цветковых растений. 1а – микроспороциста (2n), 2а – микроспора (n), 3а – пыльцевое зерно, состоящее из вегетативной и двух мужских гамет (все n). 16 – мегаспороциста, 26 – мегаспора, 36 – семиядерный зародышевый мешок с центральной клеткой (2n) и яйцеклеткой (n), 5, 6 – семя (э – эндосперм (3n), з – зародыш (2n)), 7 – проросток; черные сегменты на хромосомах – выключенные (не экспрессирующиеся) аллели, белые сегменты – экспрессирующиеся аллели.

время первых делений дробления [20]. Рисунки метилирования импринтированных генов сохраняются на всем протяжении онтогенеза во всех соматических клетках, за исключением некоторых импринтированных генов, статус метилирования которых может быть полиморфным в различные периоды онтогенеза. На сегодняшний день известен тканеспецифичный импринтинг таких генов человека, как KCNQ10T1 (11p15.5), UBE3A (15q11), SNURF-SNRPN (15q11), IGF2R (6q25.3), GRB10 (7p21), MEST (7q32.2) и ряда других [21]. Так, ген IGF2R (OMIM 147280) человека моноаллельно экспрессируется во всех тканях с одного аллеля, выбор которого является случайным, кроме мозга, где зафиксирована его биаллельная экспрессия [22]. В то же время, у мышей этот ген экспрессируется моноаллельно только с материнского гомолога во всех тканях. Этот пример показывает не только тканеспецифичный, но и эволюционный эпигенетический полиморфизм импринтинга. Ген WT1 (11p13), ассоциированный с развитием опухоли Вильмса (ОМІМ 607102), имеет импринтированную моноаллельную экспрессию только отцовского гомолога в фибробластах и лимфоцитах, моноаллельную материнскую — в плаценте и мозге,

биаллельную экспрессию в других органах (сердце, легкое, печень и кишечник) [23].

Таким образом, молекулярные механизмы регуляции экспрессии импринтированных генов у растений и животных в целом сходны, и осуществляются они через аллель-специфичное метилирование, ковалентные модификации белков хроматина, активность регуляторных некодирующих РНК. В то же время у млекопитающих экспрессия импринтированных генов обнаруживается в эмбриональных и внезародышевых тканях, а также во всех соматических клетках взрослого организма, в отличие от растений, у которых геномный импринтинг ограничен, по всей видимости, преимущественно эндоспермом — тканью, питающей развивающийся зародыш растения.

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ В ЦАРСТВЕ РАСТЕНИЙ

В царстве растений геномный импринтинг обнаружен только у покрытосеменных, или цветковых. Впервые импринтинг был описан в локусе R, кодирующем пигмент эндосперма кукурузы Zea mays, который экспрессируется только с мате-



Рис. 2. "Жизненный цикл" геномного импринтинга у млекопитающих (черные сегменты на хромосомах – выключенные (не экспрессирующиеся) аллели, белые сегменты – экспрессирующиеся аллели).

ринского гомолога [24]. Первые импринтированные гены, обнаруженные у *A. thaliana*, — это *MEA* и *FIS2*, которые останавливают пролиферацию эндосперма и необходимы для его нормального развития, хотя выполняют важные функции и в женском гаметофите. У *A. thaliana* и кукурузы (*Z. mays*) выявлены импринтированные гены, экспрессирующиеся как с отцовского, так и с материнского гомологов [25].

Семя цветковых растений состоит из трех основных компонентов: оболочки, зародыша и эндосперма, который поддерживает эмбриогенез. Рост и развитие семян требуют взаимодействия и координации отдельных генетических программ, которые регулируют развитие каждого компонента семени. Центральную роль среди этих компонентов играет эндосперм, который окружает зародыш и обеспечивает его питательными веществами, необходимыми для нормального развития. Поскольку геномный импринтинг делает родительские геномы функционально неэквивалентными, он предотвращает развитие партеногенетического эмбриона, усиливая вклад обоих родительских геномов. У цветковых растений и млекопитающих в развивающемся заролыше формируются ткани. которые обеспечивают поступление питательных веществ от матери. У млекопитающих это внезародышевые ткани (в частности, трофобласт, а затем и плацента), а у цветковых растений — эндосперм. Примечательно, что трофобласт образуется при дроблении самой зиготы, тогда как эндосперм возникает отдельно от зиготы при слиянии двух гаплоидных материнских ядер (m) с ядром второго сперматозоида (p) (2m : 1p). Таким образом, в эволюции растений импринтинг мог стать механизмом обеспечения оплодотворения центральной клетки и предотвращения партеногенетического развития эндосперма [26].

Механизмы импринтинга также могут служить барьером для межвидовой гибридизации, возможно, в качестве индикатора, который определяет необходимую дозу родительского гена. Если скрестить диплоидное (женская линия, диплоидный эмбриональный мешок) и тетраплоидное (отцовская линия, диплоидный гаметофит) растение, то в эндосперме будут преобладать отцовские хромосомы (2m : 2p, в отличие от нормального распределения – 2m : 1p), что приведет к разрастанию эндосперма и, как следствие, к крупному семени. При скрещивании тетраплоидного растения (женская линия, тетраплоидный эмбриональный мешок) с диплоидным (отцовская линия, гаплоидный гаметофит) (4m : 1p) деление клеток эндосперма замедляется, в результате чего образуются мелкие семена с небольшим эндоспермом [27]. Ген ADMETOS A. thaliana отвечает за абортацию семян с несбалансированным эндоспермом, когда нарушается нормальное соотношение 2m : 1p. При скрещивании растений с различным числом хромосом геномный импринтинг выполняет функцию репродуктивного барьера. Летальность семян также рассматривается как результат скрещивания растений с различным внутривидовым уровнем плоидности. Для получения жизнеспособных семян эндосперм кукурузы должен содержать материнский и отцовский геномы в соотношении 2:1, а изменение этой дозы нарушает переход от митотического деления клеток эндосперма к эндоредупликации. Однако даже когда растения с различным уровнем плоидности остаются жизнеспособными, синцитиальное деление эндосперма изменяется в зависимости от того, наследуются ли избыточные геномы от мужского или женского родителя. Избыток материнского генома связан с ранним развитием эндосперма, а отцовского – с его недоразвитием или отсутствием. Так, *Mimulus* – род травянистых растений, состоящий из нескольких недавно разошедшихся в эволюции видов, представляет интересную систему для изучения эффектов гибридного эндосперма. *M. guttatus* и *M. nudatus* относятся к самоопыляемым видам, а также легко скрещиваются между собой. Однако при этом изза отсутствия или замедленной пролиферации эндосперма образуются плоские или сморщенные гибридные семена [28].

Комплекс FIS-PRC2 играет центральную роль в регуляции развития эндосперма и зародыша. Этот комплекс поддерживает баланс между родительскими геномами и сдерживает развитие генетического конфликта, подавляя эндосперматогенез при отсутствии опыления, а в случае оплодотворения контролирует нормальное развитие зародыша и эндосперма. Так, мутации генов данного комплекса вызывают неконтролируемую пролиферацию центральной клетки и развитие семенной кожуры при отсутствии оплодотворения, приводя к формированию семяподобных структур с диплоидным эндоспермом, которые со временем абортируются [29]. Другие импринтированные гены включают гены биосинтеза ауксинов. Специфичные для эндосперма гены юкки, необходимые для биосинтеза ауксина, в растениях риса, кукурузы, арабидопсиса и родственных видов экспрессируются только с отцовского аллеля [30]. Ген ауксина YUC1 необходим для нормальной пролиферации эндосперма. Растения с мутациями в этом гене имеют более мелкие семена со сниженным числом клеток эндосперма.

Женский гаметофит контролирует развитие зародыша и эндосперма, подавляя их развитие в отсутствие фертилизации через импринтинг. Каким же образом происходит развитие апомиктических покрытосеменных растений, у которых зародыши возникают без мейоза и оплодотворения? В большинстве случаев при апомиксисе изменяется только способ образования зародыша, а эндосперм образуется так же, как и при половом размножении.

Таким образом, геномный импринтинг у высших растений служит, по всей видимости, барьером для полиплоидизации и межвидовой гибридизации, поддерживая баланс между родительскими геномами, и связан с развитием эндосперма как ткани, обеспечивающей питание зародыша, а женский гаметофит контролирует развитие зародыша и эндосперма, подавляя их развитие в отсутствие фертилизации.

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ В ЦАРСТВЕ ЖИВОТНЫХ

У листовых, или почвенных комариков Sciara *coprophila* описан хромосомный импринтинг – в ходе эмбриогенеза у отцовских особей происходит программируемое элиминирование половых хромосом отцовского происхождения [2]. Ключевую роль в этом процессе играет контролирующий элемент, расположенный в прицентромерном гетерохроматине короткого плеча Х-хромосомы. У мучнистого, или цитрусового червеца Planococcus citri самец и самка развиваются из оплодотворенной яйцеклетки, при этом они характеризуются половым диморфизмом – фенотипически самки похожи на имаго, а самцы на двукрылых комариков. Это обусловлено тем, что самцы, в отличие от самок, гаплоидны. В ходе онтогенеза у них происходит избирательная элиминация всего отцовского генома посредством его гетерохроматинизации. В период первых дроблений зиготического ядра будущие мужские и женские особи одинаковы, однако на 7-8-й стадии дробления при отсутствии дифференцировки клеток у мужских особей происходит избирательная инактивация и превращение всего мужского генома в гетерохроматин. Таким образом, поведение мужских и женских хромосом зависит от их родительского происхождения [31].

Геномный импринтинг характерен для двух инфраклассов млекопитающих – Metatherians (сумчатые, такие как опоссум и валлаби, имеющие элементарную плаценту) и Eutherians (истинные плацентарные, такие как человек и мышь) [32]. У Monotremata (яйцекладущие млекопитающие, такие как утконос и ехидна) импринтированные гены не обнаружены [33].

Ранние млекопитающие произошли от рептилий около 245 млн лет назад во время позднего пермского и раннего триасового периодов. Яйцекладущие млекопитающие отделились от плацентарных около 166 млн лет назад, а разделение на плацентарных и сумчатых произошло между 125 и 148 млн лет назад. Таким образом, геномный импринтинг у млекопитающих возник в эволюции примерно 150 млн лет назад.

По репродуктивной стратегии плацентарные и сумчатые млекопитающие отличаются от остальных многоклеточных животных:

виды, перешедшие на живорождение, получили преимущества, необходимые для выживания потомства в неблагоприятных условиях
плод находится в организме самки и защищен от холода и хищников, в то время как оставленное без присмотра яйцо представляет легкую добычу;

 зародыш может непосредственно влиять на объем материнских ресурсов, используемых для его собственного роста. Большинство беспозвоночных и позвоночных используют репродуктивную стратегию, связанную с откладыванием яиц, в этом случае эмбрионы не способны прямо влиять на материнские ресурсы;

– экспрессия импринтированных генов у плацентарных и сумчатых млекопитающих делает их полностью зависимыми от полового воспроизведения, запрещая возможность партеногенеза, когда женская гамета развивается в новую диплоидную особь без оплодотворения мужской гаметой, т.е. при половом размножении невозможно обойтись без отцовского генома.

Следует отметить, что развитие плаценты связано с эволюцией постзиготической репродуктивной изоляции, и оно характерно не только для млекопитающих. Так, у живородящих онихофор (Onychophora grube) осуществляется взаимодействие между системами циркуляции плода и матери. У гидроидной медузы (Crossota millsae) оплодотворенные яйцеклетки развиваются в яичниках, эмбрионы, размер которых достиг 6 мм, открепляются от материнского тела. Однако при этом они уплывают не сразу, а держатся под материнским куполом, питаясь за счет ее ресурсов. Это пример вынашивания, живорождения и выкармливания молоди за счет материнских запасов. У мшанок (Bugula flabellata и B. neritina) развивающиеся эмбрионы находятся в специальных выводковых камерах, где они сначала питаются клетками и тканями эмбриональной оболочки, поглощая их за счет фагоцитоза, пиноцитоза и активного трансмембранного транспорта. На последующих этапах развития эмбриона стенка эмбриофора разрастается, и через нее эмбрионы также получают от материнского организма питательные вещества. У сальпы, или талиацеи (Thaliacea, класс оболочников) все виды без исключения вынашивают эмбрионы бесполого поколения в материнском теле. Кроме сальпы есть еще ортонектиды и дициемиды – эндопаразиты беспозвоночных животных, которые характеризуются внутриутробным развитием с питанием за счет материнских ресурсов и живорождением. У всех трематод бесполое поколение (редии) развивается внутри материнской спороцисты, питаясь материнскими ресурсами. У рыбы-молота (Eusphyra blochii) имеется подобие плаценты, которая формируется в результате близкого расположения эмбриональных и родительских тканей, тесно контактирующих либо по всей поверхности оболочек эмбриона, либо с наиболее выступающими частями. Невозможно обойти стороной и яркий пример того, как большинство самцов отряда иглообразные (Syngnathiformes), представителем которых является морской конек (*Hippocampus*), вынашивают потомство. У большинства представителей этого отряда на брюшке самцов появляется кожная складка, куда самка мечет икру, после чего из кожной складки образуется хорошо снабжающаяся кровью сумка с плацентоподобной структурой,

в которой развиваются эмбрионы [34]. Тем не менее, импринтированные гены у морских коньков не выявлены. Таким образом, живорождение, появившееся параллельно и независимо в разных группах животных, привело к образованию различных способов внутриутробного питания эмбрионов, среди которых плацентотрофия оказалась "выгодной" для большого количества животных. Но наибольшее структурное разнообразие плацента получила именно у плацентарных.

В эволюции млекопитающих первыми импринтированными генами стали Ins, Mest, Peg10, Igf2, Igf2r и H19[17]. Интересно, что все они – бывшие вирусные гены, которые геном млекопитающих смог подчинить себе. Такие гены обнаружены и в геноме валлаби – представителя инфракласса сумчатых млекопитающих. Это консервативные гены, сохранившие свою моноаллельную экспрессию на протяжении всей эволюции млекопитающих, в том числе и у человека (кроме IGF2R). В то же время эпигенетический статус некоторых импринтированных генов изменился. Так, у человека известны 63 гена с отцовской и 34 - с материнской экспрессией, тогда как в геноме мыши имеется 50 генов с отцовской и 62 с материнской экспрессией. Шесть генов, импринтированных у мыши, у человека имеют биаллельную экспрессию, а два локуса, наоборот, импринтированы только у че-Функции этих генов разнообразны ловека. (табл. 1). Таким образом, в эволюции животных импринтированный характер генной экспрессии возник и закрепился у сумчатых и плацентарных млекопитающих, по всей вероятности, с развитием плаценты и живорождения. В то же время полиморфный характер экспрессии импринтированных генов у разных видов плацентарных млекопитающих может свидетельствовать о том, что геномный импринтинг в эволюции не полностью устоялся и находится в процессе развития.

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ В РЕГУЛЯЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО И ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕКА

Большинство импринтированных генов участвуют в эмбриональном развитии сумчатых и плацентарных млекопитающих, в том числе и человека. Они контролируют клеточную пролиферацию и дифференцировку плацентарных тканей, метаболизм некоторых гормонов и ростовых факторов [26].

В начале 80-х годов прошлого столетия J. Mc-Grath и D. Solter, а также независимо от них M.A. Surani и соавт. провели эксперименты по трансплантации пронуклеусов у мышей, впервые доказав функциональную неэквивалентность мужского и женского геномов [35, 36]. Как гиногенетические (диплоидный геном, содержащий только хромосомы матери), так и андрогенетические (диплоидный геном, содержащий только хромосомы отца) зиготы оказались неспособны к дальнейшему нормальному развитию. В первом случае (при гиногении) происходило формирование только эмбриона, который останавливался в своем развитии на стадии четырех—пяти сомитов; во втором случае (при андрогении) развивались исключительно внезародышевые структуры, что приводило к разрастанию трофобласта при отсутствии эмбриона. И только эмбрионы, имеющие один отцовский и один материнский пронуклеус, нормально развивались и давали жизнеспособное и фертильное потомство. На основании этих экспериментов выдвинута гипотеза, согласно которой в материнском геноме экспрессируются импринтированные гены, жизненно важные для развития самого эмбриона, в то время как отцовский геном обеспечивает экспрессию генов, необходимых для развития внезародышевых структур и питания эмбриона.

Моноаллельная экспрессия импринтированного гена предполагает, что для проявления патологического фенотипа достаточно мутации в одном из аллелей. Спектр таких мутаций сводится к четырем основным типам:

 – генные мутации, инактивирующие единственный экспрессирующийся аллель;

 – CNV (Copy number variation – вариации числа копий повторов ДНК), содержащие импринтированные гены; как правило, это микроделеции или микродупликации участков хромосом с

Локализация	Ген	Эпигенетиче	еский статус	фууууде*			
человек (мышь)	человек (мышь)	человек	мышь	- Функция			
7q21.3	PON3 (Pon3)	Не импринт	Импринт	Гидролиз лактонов и ингибирование окисления липопротеинов низкой плотности, замедление возникновения и прогрессирования атероскле- роза			
(6 A1)	PON2 (Pon2)	Не импринт	Импринт	Защита клеток от окислительного стресса			
	ASB4 (Asb4)	Не импринт	Импринт	Участие в убиквитинопосредованном распаде белка в протеасомах			
11p15 (7 F5)	ASCL2 (Ascl2)	Не импринт	Импринт	Активация транскрипции, участие в определении нейрональных предшественников в перифериче- ской и центральной нервной системе			
11p15.4 (7 E3)	AMPD3 (Ampd3)	Не импринт	Импринт	Катализ гидролитического дезаминирования аде- нозинмонофосфата в инозинмонофосфат в ката- болическом пути аденилата			
11q13.4 (7 F5)	DHCR7 (Dhcr7)	Не импринт	Импринт	Участие в синтезе холестерина			
12q21 (10 C3)	DCN (Dcn)	Не импринт	Импринт	Компонент соединительной ткани, связывается с фибриллами коллагена и играет роль в сборке матрикса			
18q11 (18A2-B2)	IMPACT (Impact)	Не импринт	Импринт	Участие в нейрогенезе			
Xq13	XIST (Xist)	Не импринт	Импринт	Кодирующий РНК ген — главный эффектор инактивации Х-хромосомы			
(X D)	TSIX (Tsix)	Не импринт	Импринт	Ген, кодирующий РНК, антисмысловую к Xist РНК.			
13q14 (14 D2)	RB1 (Rb1)	Импринт	Не импринт	Опухолевый супрессор, участие в регуляции транскрипции			
20q13 (2 H3)	L3MBTL (L3mbtl)	Импринт	Не импринт	Белок-регулятор группы Polycomb, участвует в ремоделировании хроматина, тем самым подав- ляя экспрессию генов			

Таблина 1	I. V	1 мпринти	рованные	гены	человека	и мыши	с полимої	рф	ным	эпиген	нетичес	ким	стату	лсом
тестица		impillilli	pobulilible	rentbi	restobend	II MIDILLII	0 110311110	$-\psi$	11 DI IVI	orner or	10111 100		erary	00101

Примечание: Импринт – импринтированный ген; Не импринт – не импринтированный ген. * Информация согласно базе данных GeneCards [http://www.genecards.org].

11

локализованными в них импринтированными генами;

 полные и сегментные однородительские дисомии (ОРД) хромосом, изменяющие баланс дозы генов материнского и отцовского происхождения в геноме;

 – эпимутации – наследуемые и ненаследуемые изменения экспрессии гена, не связанные с нарушением его нуклеотидной последовательности, а обусловленные эпигенетическими модификациями ДНК или белков хроматина.

Мутации этих типов регистрируются как в пренатальном, так и в постнатальном развитии человека. Однако в постнатальном периоде преобладают CNV (53%), тогда как в пренатальном периоде отбор направлен на эпимутации в импринтированных генах (65%) (табл. 2), т.е. отбор действует преимущественно против регуляторных и потенциально обратимых эпигенетических модификаций, но не структурных нарушений, таких как делеции, ОРД или точечные мутации. Решающее значение для развития и функционирования плаценты во время беременности имеют импринтированные гены, поддерживающие баланс между материнскими ресурсами и потребностями эмбриона [38]. Эпимутации связаны, в первую очередь, с аномалиями дифференциального метилирования импринтированных генов - гиперметилированием активного аллеля, что приводит к подавлению экспрессии гена на обоих гомологах и гипометилированию неактивного локуса, формирующего экспрессию двойной дозы гена. Глобальное гипометилирование материнских импринтированных аллелей показано при биродительском полном пузырном заносе у человека. Функционально такой эпигенетический статус материнского генома эквивалентен наследованию обоих хромосомных наборов от отца, как при классическом полном пузырном заносе [39].

Эпимутации как отдельных импринтированных генов, так и мультилокусные дефекты метилирования описаны при остановке эмбрионального развития. Так, эпимутации одновременно в двух импринтированных аллелях — в центре импринтинга *KCNQ10T1* и гене *PLAGL1* – обнаружены нами при изучении статуса метилирования импринтированных локусов во внезародышевых тканях (цитотрофобласт хориона и внезародышевая мезодерма) спонтанных абортусов I триместра беременности (в 2.3% случаев) [40, 41]. Позднее свидетельства нарушений функционального статуса импринтированных локусов генома у спонтанных абортусов получены и в других исследованиях как при анализе экспрессии, так и при изучении характера метилирования импринтированных генов. Так, Diplas и соавт. [42] при внутриутробной задержке роста плода обнаружили повышенную экспрессию импринтированных генов PHLDA2, ILK2, NNAT, CCDC86 и PEG10, тогда как PLAGL1, DHCR24, ZNF331, CDKAL1 имели, напротив, сниженную экспрессию. Показано также гипометилирование генов DLK1, H19 и SNRPN.

Doria и соавт. [43] обнаружили повышение экспрессии гена *PHLDA2* и снижение экспрессии *PEG10* у спонтанных абортусов по сравнению с контролем (ткани плода в III триместре беременности). Pliushch и соавт. [44] при анализе плодных тканей выявили множественное гиперметилирование импринтированных генов у 4% (2 из 55) спонтанных абортусов и в 18% (10 из 57) случаев мертворождений. Проведен анализ генов H19, LIT1, PEG3 и SNRPN, экспрессирующихся с отцовского гомолога, и двух генов — *MEG3* и *NESP55*, экспрессирующихся в норме с материнской хромосомы. Zechner и соавт. [45] в выборке спонтанных абортусов показали гиперметилирование генов INS, *TRPM5*, *PWCR1*, *GABRA5* с отцовской экспрессией и только одного гена, Н19, экспрессирующегося на материнском гомологе.

	Период развития				
тип мутации	пренатальный, %*	постнатальный, %**			
Однородительские дисомии	14	17			
CNV	18	53			
Точковые мутации в импринтированных генах	3	5			
Эпимутации импринтированных генов	65	25			
Всего:	100	100			

Таблица 2. Спектр и частота мутаций импринтированных генов в пре- и постнатальном периоде развития человека

* Результаты анализа 162 случаев (из 8246) нарушений геномного импринтинга в пренатальном периоде развития (анализ 43 статей по запросу "imprinted gene mutations in spontaneous abortions", "uniparental disomy in spontaneous abortions", "SNP microarray analysis of spontaneous abortion", "microarray analysis and next-generation sequencing of spontaneous abortions" в поисковой базе данных PubMed от 08.04.2020); ** по данным обзора Grafodatskaya и соавт. [37].

По нашим данным, в плацентарных тканях (цитотрофобласт хориона и внезародышевая мезодерма) спонтанных абортусов I триместра беременности с нормальным кариотипом частота эпимутаций составила 5%. Среди эпимутаций преобладало постзиготическое гипометилирование импринтированных генов на хромосомах материнского происхождения, составившее 4.2% [46]. У каждого заролыша выявлены множественные эпимутации. затрагивающие одновременно от четырех до 12 импринтированных генов. Эпимутации были представлены гипометилированием таких импринтированных генов, как GRB10, CPA4, PHLDA2, ZNF215, экспрессирующихся в норме с материнского гомолога, и PEG10, PLAGL1, WT1, HTR2A, DLK1, GA-BRB3, KCNQ1, функционирующих только на отцовской хромосоме.

На сегодняшний день известно о 13 болезнях геномного импринтинга (табл. 3), проявляющихся, как правило, нарушением роста, физического и интеллектуального развития, обмена веществ и дифференцировки центральной нервной системы [47]. Болезни геномного импринтинга обусловлены преимущественно нарушением конкретных импринтированных локусов. При этом в одной и той же импринтированной области могут возникать разнонаправленные эпимутации, которые приведут к формированию клинической картины различных заболеваний. Например, гипометилирование центра импринтинга *H19* (11p15.5) на хромосоме материнского происхождения объясняет до 30-60% случаев синдрома Рассела-Сильвера, тогда как гиперметилирование этого региона на хромосоме отцовского происхождения отмечено в 5% случаев синдрома Видеманна-Беквита [48].

Таким образом, нарушения экспрессии импринтированных генов встречаются как в пренатальном, так и в постнатальном периоде развития человека. В структуре причин нарушений геномного импринтинга у живорожденных индивидов преобладают CNV, а в пренатальном периоде развития — эпимутации в импринтированных генах. Приведенные данные доказывают участие импринтированных генов в регуляции эмбрионального развития.

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ В НЕОНАТАЛЬНОМ РОСТЕ И РАЗВИТИИ МОЗГА

Геномный импринтинг в эволюции шел не только по пути участия в регуляции развития плаценты, но и формирования головного мозга под влиянием плаценты и давления отбора, регулирующего материнство [49]. Формирующийся мозг является одной из мишеней, на которую действует геномный импринтинг. Это впервые показали E.B. Keverne и соавт. в 1996 г. [50], изучавшие гиногенетические и андрогенетические дисомные химерные клетки мыши в мозге. Первые из них были распределены по всей коре, стриатуму и гиппокампу, в то время как андрогенетические клетки обнаружены преимущественно в гипоталамусе, что указывало на различную роль генетической информации, передаваемой по материнской и отцовской линии, в различных областях мозга [51].

Импринтированные гены служат центрами контроля функций мозга, обеспечивают регуляцию и стабильный транскрипционный контроль развития нервной системы и поведения. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что геномный импринтинг вовлечен в ключевые процессы развития нервной системы, включая экспансию, миграцию и дифференцировку нейрональных предшественников и поляризацию клеток [49]. И

Таблица З.	Болезни геномного импринтинга в постнатальном периоде развития человека

Синдром	OMIM	Регион
Транзиторный неонатальный сахарный диабет	601410	6q24
Бирка–Барела	612292	8q24.3
Рассела-Сильвера	180860	11p15.5, 7p11.2–p13, 7q31
Видеманна-Беквита	130650	11p15.5
IMAGe	614732	11p15.4
Прадера-Вилли	176270	15q11-q13
Шааф–Янга (Прадера–Вилли-подобный синдром)	615547	
Ангельмана	608636	
Дупликации 15q11-q13	608636	
Темпла	616222	14q32
Кагами–Огата	608149	
Псевдогипопаратиреоз типа 1А	103 580	20q13.3
Псевдогипопаратиреоз 1В	603233	

действительно, для нейрональной дифференцировки требуется индукция многих факторов транскрипции, чтобы активировать нейроспецифичные программы транскрипции. Импринтированные гены играют важную роль в этом процессе. В развивающемся мозжечке транскрипция гена Zac1/Plagl1, экспрессирующегося с отцовского аллеля, ограничивается желудочковой зоной и наружным гранулярным слоем специфических долек, где она способствует дифференцировке ГАМК-ергических интернейронов и клеток Гольджи [52]. Экспрессирующийся в норме с отцовского гомолога ген Dio3 защищает развивающийся мозжечок от преждевременной стимуляции тиреоидным гормоном, который контролирует образование гранулярных клеток во внешнем зародышевом слое, их миграцию во внутренний слой мозжечка и ветвление дендритов клеток Пуркинье [53]. Соответственно, делеции Dio3 приводят к исчезновению внешнего слоя и нарушению опорно-двигательного аппарата.

В развивающемся мозге миграция нейронов в нужные участки имеет большое значение для установления надлежащей идентичности и функциональной связи. Этот этап дифференцировки также опосредован клеточными процессами, которые зависят от геномного импринтинга. Полимеризация актина, которая имеет решающее значение для подвижности клеток в кортикальной пластинке, активируется, в том числе, импринтированным геном CDKN1C с материнской экспрессией [54]. Тангенциальная миграция дифференцирующихся ГАМК-ергических интернейронов из базального переднего мозга в кору головного мозга требует повышенной транскрипционной активности комплекса DLX2-NDN [55]. Соответственно, кортикальная ГАМК-ергическая система нарушается при делеции гена NDN на отцовском гомологе. Отсутствие экспрессии этого гена приводит к нарушению развития нервной системы при синдроме Прадера-Вилли [56].

Важное значение для миграции нейронов имеет также нейрональная активность. В частности, экспрессирующийся в норме с материнского аллеля *КСNK9* контролирует потенциалы покоя и нейрональную возбудимость, а мутации, передаваемые по материнской линии, блокируют миграцию нейронов и задерживают созревание дендритов, вызывая развитие синдрома Бирка—Барела [57]. В результате у больных с данным синдромом наблюдается умственная отсталость (от умеренной до тяжелой), гиперактивность и проблемы с питанием в младенческом возрасте.

Внимание к эволюционному ремоделированию мозга в связи с геномным импринтингом усилилось после открытия импринтированных генов, связанных с апоптозом [49]. В развивающейся нервной системе апоптоз служит для контроля общего нейронного пула и согласованной работы пре- и постсинаптических нейронов. Апоптоз регулируется внутренними и внешними стимулами, сдвигающими баланс между проапоптотическими (запускают апоптоз) и антиапоптотическими (подавляют апоптоз) белками. В проапоптотическом состоянии проницаемость митохондриальных мембран увеличивается, что приводит к высвобожению цитохромов, активации каспазы и последующей гибели клеток. Как правило, импринтированные гены, экспрессирующиеся только с отцовского гомолога, являются антиапоптотическими, тогда как с материнской хромосомы экспрессируются проапоптотические гены [58]. Так, ген Blcap, импринтированный у мыши и человека, имеет моноаллельную материнскую экспрессию в мозге и биаллельную – в плаценте. Этот ген относится к проапоптопическим, так как является опухолевым супрессором, который ограничивает пролиферацию клеток и стимулирует апоптоз. Белок BLCAP отсутствует во многих типах опухолей человека [59, 60]. Экспрессируемый с материнского гомолога MEG3 также может играть проапоптотическую роль в головном мозге, подавляя формирование опухолей гипофиза через транскрипционную активацию р53 [61].

Ген UBE3A (убиквитинзависимая лигаза ЕЗ) импринтирован в клетках мыши и человека, в клетках Пуркинье мозжечка и в нейронах гиппокампа он экспрессируется исключительно с материнского аллеля [62]. Убиквитинлигаза ЕЗ участвует в деградации белков в клетках, удаляя тем самым поврежденные или ненужные белки и помогая поддерживать нормальную функцию клеток. Убиквитинируя P53, UBE3A может играть также антиапоптотическую роль [63], а его делеция на материнской хромосоме приводит к уменьшению размера мозга. Подавление экспрессии этого гена считается причиной развития синдрома Ангельмана и специфических для этого синдрома признаков - задержки психического развития, эпилепсии, атаксии, частых приступов смеха, стереотипных движений рук, отсутствия речи, сопровождается глубокой умственной отсталостью, аутизмом нарушением сна и судорогами.

Ген *PEG3* человека экспрессируется моноаллельно с отцовского гомолога. Он кодирует белок, который участвует в p53-опосредованном апоптозе, действуя как опухолевый супрессор. Гиперметилирование, подавляющее экспрессию *Peg3* мыши, индуцирует P53-зависимый апоптоз в переднем мозге, полосатом теле, миндалине и гипоталамусе. У человека ген *NDN* с отцовской экспрессией предотвращает апоптоз в клетках мозжечковых гранул, блокируя трансактивацию E2F проапоптотических мишеней [58].

Интерес вызывает и то, что одни и те же гены могут быть импринтированы как в развивающемся гипоталамусе, так и в плаценте – двух структурно и функционально различных структурах. Плацента млекопитающих связывает мать и плод через эндокринные сигналы, которые нацелены на материнский гипоталамус, подготавливая женщину к родам, лактации и материнству. Изучение мышей, несущих мутацию в импринтированном гене Peg3, позволило получить ответ на некоторые вопросы о том, как функционирует гипоталамус плода, который в ходе пренатального развития вырабатывает плацентарные гормоны, определяющие хорошую заботу матери о потомстве [38]. Делеция этого гена только в клетках гипоталамуса самки, либо только в плаценте имела функционально схожие последствия — нарушение заботы самки о потомстве. Таким образом, по-видимому, действие этого гена эволюционно коадаптировано в гипоталамусе матери и плаценте. Известны также импринтированные гены Necdin, Peg1/Mest и Magel2 со схожей с *Peg3* нейроэндокринной функцией, связанной с успешным материнством [64]. Отсутствие экспрессии одного из этих генов приводит к снижению уровня окситоцина в нейронах мыши, как и при гиперметилировании Peg3, поскольку эти гены в норме участвуют в синтезе гормонов, важных для родов и заботы о потомстве [65]. Кроме того, продукты генов Peg3 и Necdin взаимодействуют с *Hifla* и *Arnt*. *Arnt* кодирует белок HLH-PAS, который связывается с *Sim1*, участвуя тем самым в развитии окситоцинергических нейронов гипоталамуса [66]. Любопытно, что *Hif1a* и Arnt также вовлечены в развитие плаценты, они участвуют в дифференцировке гигантских клеток, которые продуцируют гормоны плаценты, регулирующие материнское поведение. Импринтированный ген Phlda2 экспрессируется с материнского гомолога в плаценте, а его продукт воздействует на мозг матери через такие гормоны, как плацентарные лактогены [67, 68].

Импринтированный ген GRB10 в эмбриональном головном и спинном мозге человека экспрессируется только с отцовского аллеля, а в плаценте – только с материнского [69]. Во всех остальных тканях плода экспрессия гена GRB10 имеет биаллельный характер. Предполагается, что экспрессия GRB10 в плаценте может быть эволюционно важной для контроля роста плода. Продукт гена принадлежит к адаптерным белкам, которые взаимодействуют с рядом рецепторов тирозинкиназ и сигнальных молекул. с рецепторами инсулина и инсулиноподобного фактора роста. Избыточная экспрессия некоторых изоформ белка GRB10 ингибирует активность тирозинкиназы и таким образом подавляет рост клеток. Действительно, потеря экспрессии материнского аллеля в эмбриогенезе приводит к значительному росту плода и плаценты, что нарушает правильное распределение материнских ресурсов, требуемых для этого процесса. В то же время нарушение моноаллельной экспрессии Grb10 в мозге мышей приводит к повышенному социальному доминированию, особенно по сравнению с другими аспектами социального поведения, что подтверждается увеличением аллогруминга у самцов с дефицитом Grb10 [70, 71]. Противоположная моноаллельная экспрессия в плаценте по сравнению с мозгом поддерживает гипотезу о том, что импринтинг GRB10 мог эволюционировать, чтобы дифференцировать плейотропные эффекты этого гена в пренатальном росте и поведении млекопитающих.

Важно отметить, что гипоталамус плода и плацента развиваются в период, критически значимый для формирования плацентарного кровоснабжения, обеспечивая тем самым питание плода и выработку гормонов плаценты, которые регулируют гипоталамус матери. Таким образом, плацента участвует в развитии гипоталамуса плода, а гипоталамус матери предоставляет ресурсы для этого. Интересно, что плацентарные стволовые клетки могут дифференцироваться в нейроны [72]. Такая связь коадаптации плаценты и материнского мозга гарантирует, что потомство, которое имело "хорошее" материнское воспитание, будет хорошо обеспечено и генетически предрасположено к формированию гипоталамуса, который определит заботу матери о ее потомстве и в следующем поколении [73].

В ходе эволюции мозг млекопитающих подвергся значительному росту по сравнению с мозгом других позвоночных, и это продолжается, достигая пика у больших обезьян и гоминид. Неокортекс (новая кора) – это наиболее развивающаяся в эволюции кора головного мозга. Она располагается в верхнем слое полушарий мозга и отвечает за высшие нервные функции – сенсорное восприятие, выполнение моторных команд, осознанное мышление и, у людей, речь. Неокортекс в основном развивается после рождения, когда все млекопитающие находятся в тесной связи с их матерями и социальными группами. Он содержит клетки двух основных типов: пирамидные нейроны (~80%) и ГАМК-ергические интернейроны (~20%). ГАМКергические нейроны являются неотъемлемой частью развития цитоархитектуры неокортекса. На ранних стадиях эмбрионального развития они деполяризуют основные нейроны, увеличивая содержание внутриклеточного кальция, необходимого для роста нейронов и их дифференцировки [74]. Импринтированный и экспрессирующийся только на отцовском гомологе ген Necdin действует как супрессор роста постмитотических нейронов. Гипометилирование этого гена у мышей приводит к уменьшению популяции клеток неокортекса (ГАМК-ергических нейронов) и предрасположенности к судорогам.

Таким образом, эволюция геномного импринтинга проходила одновременно по пути участия в развитии мозга и регуляции плаценты, в формировании головного мозга под влиянием плаценты и давлении отбора, регулирующего материнство.

ГИПОТЕЗЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ГЕНОМНОГО ИМПРИНТИНГА В ЭВОЛЮЦИИ

В эволюции геномный импринтинг возник у некоторых насекомых, но закрепился он у сумчатых и плацентарных млекопитающих, а также у покрытосеменных, или цветковых растений. Результатом геномного импринтинга стала гаплоидизация локусов, играющих ключевую роль в обеспечении нормального эмбрионального развития посредством влияния на уровень экспрессии генов, контролирующих рост эмбриона, пролиферацию и дифференцировку клеток, другие процессы внутриутробного развития плода, плаценты, ЦНС и метаболизма у животных [49], а также в регуляции развития семян с участием эндосперма у покрытосеменных растений. В любом случае, для нормального развития организма необходимы оба родительских генома.

Появление геномного импринтинга в эволюции объясняется несколькими гипотезами. Одна из них предполагает, что импринтинг развился в качестве защиты от партеногенеза и связанных с ним нарушений развития, чтобы избежать высокой частоты гомозиготизации вредных рецессивных мутаций [75]. Кроме того, согласно гипотезе "замедленной бомбы" геномный импринтинг, возможно, появился, чтобы сохранить ооциты от летальной тератомы яичников, формирующейся при партеногенезе [76]. Еще одна гипотеза – "трофобластная защита" – предполагает, что материнский геном находится в условиях повышенного риска, поскольку мать анатомически приспособлена к внутриутробному воспроизведению. И этот риск возникает, если спонтанная активация яйцеклетки может привести к полному эмбриональному развитию. Таким образом, предполагается, что импринтинг либо подавляет в материнском геноме экспрессию генов, стимулирующих развитие плаценты, либо активирует гены, лимитирующие этот процесс. Следовательно, после того как произошло оплодотворение, гены, необходимые для формирования плаценты, должны экспрессироваться только с отцовского генома [77].

Для объяснения адаптивного преимущества импринтинга в эволюции плацентарных млекопитающих предложены еще несколько гипотез. Одна гипотеза, "оборонительная", объясняет роль геномного импринтинга с точки зрения защиты генома хозяина от проникновения в него чужеродных генетических элементов. Согласно этой гипотезе, импринтинг, в частности метилирование ДНК – это защитный механизм, обеспечивающий инактивацию паразитических ДНК, таких как транспозоны и провирусная ДНК [78]. Уникальная особенность плаценты млекопитающих – наличие трофобласта. Импринтированный ген PEG10 с отцовской экспрессией играет существенную роль в дифференцировке клеток трофобласта в спонгиотрофобластном и лабиринтном слоях. Если это так, то "одомашнивание" PEG10 было критическим событием в появлении современных плацентарных живородящих организмов [79, 80]. Ген Peg10, необходимый для развития плаценты, был позаимствован путем горизонтального переноса сумчатыми млекопитающими у ретротранспозона Sushiichi, относящегося к семейству Ту3/gypsy и имеюшего длинные концевые повторы (LTR, long terminal repeat). Делеция этого гена приводит к ранней эмбриональной летальности у мышей в связи с отсутствием в плаценте спонгиотрофобластных и лабиринтных слоев [81]. Еще один импринтированный ген Peg11 (также известный как Rtl1) – это одомашненный ретротранспозон семейства Ту3/дурѕу. Нокаут данного гена приводит к фетальной летальности у мышей [82], обусловленной тяжелыми дефектами капилляров в лабиринтном слое плаценты.

Однако наиболее популярна гипотеза, которая предполагает, что геномный импринтинг возник в ответ на ситуацию "конфликта полов" или коадаптацию отцовского и материнского геномов в регуляции роста плода [83]. Увеличение плаценты и массы плода может обеспечить преимущественное размножение потомков по линии отца, но при этом истощит ресурсы матери. Однако если рост плаценты и плода находится под материнским контролем, то она сможет обеспечить воспроизводство большего числа потомков. Эта ситуация возникает в силу противоположных интересов материнского и отцовского геномов и стоящих за ними стратегий репродуктивного поведения самок и самцов млекопитающих. Отсюда можно предположить, что мать будет выключать (импринтировать) гены, способствующие росту плаценты и плода, тогда как отец будет подавлять экспрессию генов, препятствующую этому росту. Поэтому, отцовские импринтируемые экспрессируемые аллели, как правило, стимулируют рост эмбриона, максимизируя конкурентоспособность индивидуального потомка, имеющего конкретный отцовский геном. Материнские импринтированные гены, наоборот, подавляют рост плода, чтобы распределить материнские ресурсы между как можно большим числом потомков, которые могут иметь разные отцовские геномы. Эта гипотеза успешно объясняет экспрессию в плаценте генов, стимулирующих рост (IGF2, INS, PEG1/MEST и *КСNO10T1*), только на отцовских гомологах и экспрессию только на материнских гомологах ингиби-

торов роста (*H19*, *GNAS*, *CDKN1C*, *KCNQ10T1* и *GRB10/MEG1*) [81].

Гипотеза "конфликта полов" хорошо объясняет особенность взаимозависимой экспрессии импринтированных генов *Igf2* и *Igf2r* у мыши [38]. Igf2 стимулирует рост эмбриона и экспрессируется только с отцовского аллеля. Этот ген увеличивает поступление питательных веществ от матери эмбриону. Крупные эмбрионы имеют больше шансов на выживание (что удовлетворяет интересам отца), однако для матери крупный эмбрион может оказаться слишком дорогим. Поэтому ей выгодно ограничить поступление питательных веществ к конкретному эмбриону, оставив часть своих ресурсов другим эмбрионам от других отцов. Этим объясняется отсутствие экспрессии *Igf2* с материнского аллеля. Igf2r подавляет рост эмбриона и экспрессируется только с материнского аллеля. Связывание Igf2r с Igf2 приводит к деградации обоих белков, поэтому Igf2r действует как антагонист *Igf2*. Таким образом, импринтированные гены Igf2 и Igf2r служат оружием в войне отцов и матерей за ресурсы, которые мать может предоставить эмбриону.

Импринтированную экспрессию генов растений трудно объяснить с позиции "конфликта полов". Так, импринтированный ген Meg1 кукурузы способствует дифференцировке клеток, переносящих питательные вещества эндосперма, и, следовательно, питанию развивающегося семени [82]. Увеличение дозы Meg1 приводит к увеличению эмбрионов и эндосперма. Таким образом, Meg1 -это именно тот тип гена, у которого, по прогнозам, должен быть метилирован материнский аллель, но, вопреки ожиданиям, он экспрессируется. Сходным образом двойная экспрессия импринтированного и в норме экспрессирующегося с материнского аллеля гена AtFH5 у A. thaliana, может вызвать чрезмерный рост эндосперма, участвующего в передаче зародышу материнских ресурсов [83].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюция геномного импринтинга шла в направлении регуляции эмбрионального и неонатального роста, а также развития головного мозга и закрепилась у сумчатых и плацентарных млекопитающих, а также у цветковых растений. С первым направлением связано развитие плаценты, а значит и возникновение такой потенциально рискованной стратегии, как живорождение, поэтому любые проблемы в развитии представляют угрозу не только для будущего поколения, но и для самой матери. В ходе эволюции был выработан жесткий контроль над регуляцией дозы генов путем их моноаллельной экспрессии, т.е. через геномный импринтинг. Второе направление неотьемлемо связано с развитием неокортекса, который отвечает за высшие нервные функции — сенсорное восприятие, выполнение моторных команд, осознанное мышление, речь. Существование гипоталамо-плацентарной коадаптации и важность импринтированных генов, которые представлены в этих структурах, обеспечивает успешное протекание беременности, а значит, пренатальное развитие, заботу о потомстве и интеллектуальное развитие ребенка.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50333.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований, выполненных с использованием биологических материалов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Crouse H.V. (1960) The controlling element in sex chromosome behavior in *Sciara*. *Genetics*. **45**(10), 1429–1443.
- Singh P.B., Belyakin S.N. (2018) L Chromosome behaviour and chromosomal imprinting in *Sciara coprophila. Genes* (Basel). 9(9), E440.
- 3. Rodrigues J.A., Zilberman D. (2015) Evolution and function of genomic imprinting in plants. *Genes*. **29**(24), 2517–2531.
- 4. Renfree M.B., Hore T.A., Shaw G. (2009) Evolution of genomic imprinting: insights from marsupials and monotremes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **10**, 241–262.
- 5. Woo H.R., Dittmer T.A., Richards E.J. (2008) Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **4**(8), e1000156.
- 6. Lindroth A.M., Cao X., Jackson J.P. (2001) Requirement of CHROMOMETHYLASE 3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science*. **292**(5524), 2077–2080.
- 7. Cao X., Jacobsen S.E. (2002) Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* **12** (13), 1138–1144.
- Han Q., Bartels A., Cheng X., Meyer A., An Y.C., Hsieh T.F., Xiao W. (2019) Epigenetics regulates reproductive development in plants. *Plants* (Basel). 8(12), e564.
- 9. Cokus S.J., Feng S., Zhang X. (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*. **452**(7184), 215–219.
- Геращенков Г.А., Ясыбаева Г.Р., Рожнова Н.А., Чемерис А.В. (2016) Механизмы геномного импринтинга у цветковых растений. Изв. Уфимского научного центра РАН. 3, 42–52.
- Ibarra C.A., Feng X., Schoft V.K., Hsieh T.F., Uzawa R., Rodrigues J.A., Zemach A., Chumak N., Machlicova A., Nishimura T., Rojas D., Fischer R.L., Tamaru H., Zilberman D. (2012) Active DNA demethylation in plant

16

companion cells reinforces transposon methylation in gametes. *Science*. **337**(6100), 1360–1364.

- Jullien P., Susaki D., Yelagandula R. (2012) DNA methylation dynamics during sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 22(19), 1825–1830.
- 13. Kohler C., Wolff P., Spillane C. (2012) Epigenetic mechanisms underlying genomic imprinting in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**, 331–352.
- Batista R.A., Moreno-Romero J., Qiu Y., van Boven J., Santos-González J., Figueiredo D.D., Köhler C. (2019) The MADS-box transcription factor *PHERES1* controls imprinting in the endosperm by binding to domesticated transposons. *Elife.* 2(8), e50541.
- Schmidt A., Wöhrmann H.J., Raissig M.T., Arand J., Gheyselinck J., Gagliardini V., Heichinger C., Walter J., Grossniklaus U. (2013) The Polycomb group protein MEDEA and the DNA methyltransferase MET1 interact to repress autonomous endosperm development in *Arabidopsis. Plant J.* **73**(5), 776–787.
- Wolf J.B., Brandvain Y. (2014) Gene interactions in the evolution of genomic imprinting. *Heredity* (Edinb). 12(10), e1038.
- 17. http://igc.otago.ac.nz каталог импринтированных генов и родительских эффектов у человека и животных.
- Gehring M., Satyaki P.R. (2017) Endosperm and imprinting, inextricably linked. *Plant Physiol.* 173(1), 143–154.
- Тихонов А.В., Ефимова О.А., Пендина А.А., Баранов В.С. (2017) Эпигенетическое репрограммирование ДНК в гаметах и доимплантационных эмбрионах человека. *Мед. генетика.* 16(5), 17–25.
- 20. Thamban T., Agarwaal V., Khosla S. (2020) Role of genomic imprinting in mammalian development. *J. Biosci.* **45**, e 20.
- Саженова Е.А., Лебедев И.Н. (2019) Эпигенетический мозаицизм при болезнях геномного импринтинга. *Генетика*. 55(10), 1137–1150
- Baran Y., Subramaniam M., Biton A. (2015) The landscape of genomic imprinting across diverse adult human tissues. *Genome Res.* 25(7), 927–936.
- 23. Nishiwaki K., Niikawa N., Ishikawa M. (1997) Polymorphic and tissue-specific imprinting of the human Wilms tumor gene *WT1. Jpn. J. Hum. Genet.* **42**(1), 205–211.
- Kermicle J.L. (1970) Dependence of the R-mottled aleurone phenotype in maize on mode of sexual transmission. *Genetics*. 66, 69–85.
- Tuteja R.1., McKeown P.C., Ryan P., Morgan C.C., Donoghue M.T., Downing T., O'Connell M.J., Spillane C. (2019) Paternally expressed imprinted genes under positive Darwinian selection in *Arabidopsis thaliana. Mol. Biol. Evol.* 36(6), 1239–1253.
- 26. Ferguson-Smith A.C., Bourc'his D. (2018) The discovery and importance of genomic imprinting. *Elife*. 7, e42368.
- Gehring M. (2019) Epigenetic dynamics during flowering plant reproduction: evidence for reprogramming? *New Phytol.* 224(1), 91–96.
- 28. Oneal E., Willis J.H., Franks R.G. (2016) Disruption of endosperm development is a major cause of hybrid seed

inviability between *Mimulus guttatus* and *Mimulus nudatus*. New Phytol. **210**(3), 1107–1120.

- Kradolfer D., Wolff P., Jiang H., Siretskiy A., Kohler C. (2013) An imprinted gene underlies postzygotic reproductive isolation in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Cell.* 26, 525–535.
- 30. Klosinska M., Picard C.L., Gehring M. (2016) Conserved imprinting associated with unique epigenetic signatures in the *Arabidopsis* genus. *Nat. Plants.* **2**, e16145.
- Filia A.G., Fenn-Moltu G., Ross L. (2019) No evidence for an intragenomic arms race under paternal genome elimination in *Planococcus mealybugs*. J. Evol. Biol. 32(5), 491–504.
- Das R.I., Hampton D.D., Jirtle R.L. (2009) Imprinting evolution and human health. *Mamm. Genome.* 20(9– 10), 563–572.
- Wolf J.B., Brandvain Y. (2014) Gene interactions in the evolution of genomic imprinting. *Heredity* (Edinb). 12(10), e1038.
- Ostrovsky A.N., Lidgard S., Gordon D.P., Schwaha T., Genikhovich G., Ereskovsky A.V. (2016) Matrotrophy and placentation in invertebrates: a new paradigm. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 91(3), 673–711.
- McGrath J., Solter D. (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*. 220, 1300–1303.
- Surani M.A., Barton S.C., Norris M.L. (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*. 308, 548–550.
- Grafodatskaya D., Choufani S., Basran R. (2017) An update on molecular diagnostic testing of human imprinting disorders. *J. Pediatr. Genet.* 6(1), 3–17.
- Cassidy F.C., Charalambous M. (2018) Genomic imprinting, growth and maternal-fetal interactions. *J. Exp. Biol.* 221, jeb164517.
- Hemida R., van Doorn H., Fisher R. (2016) A novel genetic mutation in a patient with recurrent biparental complete hydatidiform mole: a brief report. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 26(7), 1351–1353.
- 40. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. (2008) Эпимутации центра импринтинга *КСNQ10T1* хромосомы 11 при ранней эмбриональной гибели у человека. *Генетика.* 44(12), 1609–1616.
- 41. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. (2010) Эпимутации импринтированного гена *PLAGL1* при привычном невынашивании беременности. *Med. генетика*. **9**(11), 34–39.
- 42. Diplas A.I., Lambertini L., Lee M.J. (2009) Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics*. **4**(4), 235–240.
- 43. Doria S., Sousa M., Fernandes S., Ramalho C., Brandao O., Matias A., Barros A., Carvalho F. (2010) Gene expression pattern of *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C* imprinted genes in spontaneous miscarriages or fetal deaths. *Epigenetics*. **5**(5), 444–450.
- 44. Pliushch G., Schneider E., Weise D., El Hajj N., Tresch A., Seidmann L., Coerdt W., Müller A.M., Zechner U., Haaf T. (2010) Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths. *Am. J. Pathol.* **176**(3), 1084–1090.

- 45. Zechner U., Pliushch G., Schneider E., El Hajj N, Tresch A., Shufaro Y., Seidmann L., Coerdt W., Müller A.M., Haaf T. (2010) Quantitative methylation analysis of developmentally important genes in human pregnancy losses after ART and spontaneous conception. *Mol. Hum. Reprod.* 16(9), 704–713.
- 46. Саженова Е.А., Никитина Т.В., Скрябин Н.А., Минайчева Л.И., Иванова Т.В., Немцева Т.Н., Юрьев С.Ю., Евтушенко И.Д., Лебедев И.Н. (2017) Эпигенетический статус импринтированных генов в плаценте при привычном невынашивании беременности. Генетика. 53(3), 364–377
- 47. Monk D., Mackay D.J., Eggermann T., Maher E.R., Riccio A. (2019) Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact. *Nat. Rev. Genet.* 20(4), 235–248.
- Delaval K., Wagschal A., Feil R. (2006) Epigenetic deregulation of imprinting in congenital diseases of aberrant growth. *Bioessays*. 28(5), 453–459.
- Tucci V., Isles A.R., Kelsey G., Ferguson-Smith A.C. (2019) Genomic imprinting and physiological processes in mammals. *Cell.* 176(5), 952–965.
- Keverne E.B., Martel F.L., Nevison C.M. (1996) Primate brain evolution: genetic and functional considerations. *Proc. Biol. Sci.* 263(1371), 689–696.
- Keverne E.B. (2001) Genomic imprinting and the maternal brain. *Prog Brain Res.* 133, 279–285.
- 52. Chung S.H., Marzban H., Aldinger K., Dixit R., Millen K., Schuurmans C., Hawkes R. (2011) Zac1 plays a key role in the development of specific neuronal subsets in the mouse cerebellum. *Neural. Dev.* **6**, e25.
- 53. Peeters R.P., Hernandez A., Ng L., Ma M., Sharlin D.S., Pandey M., Simonds W.F., St Germain D.L., Forrest D. (2013) Cerebellar abnormalities in mice lacking type 3 deiodinase and partial reversal of phenotype by deletion of thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *Endocrinology*. **154**(1), 550–561.
- 54. McNamara G.I., Davis B.A., Browne M., Humby T., Dalley J.W., Xia J., John R.M., Isles A.R. (2018) Dopaminergic and behavioural changes in a loss-of-imprinting model of *Cdkn lc. Genes Brain Behav.* 17(2), 149–157.
- Kuwajima T., Nishimura I., Yoshikawa K. (2006) Necdin promotes GABAergic neuron differentiation in cooperation with Dlx homeodomain proteins. *J. Neurosci.* 26(20), 5383–5392.
- Cassidy S.B., Schwartz S., Miller J.L., Driscoll D.J. (2012) Prader–Willi syndrome. *Genet. Med.* 14(1), 10–26.
- Soellner L., Begemann M., Mackay D.J., Grønskov K., Tumer Z., Maher E.R., Temple I.K., Monk D., Riccio A., Linglart A., Netchine I., Eggermann T. (2017) Recent advances in imprinting disorders. *Clin. Genet.* 91, 3–13.
- Perez J.D, Rubinstein N.D., Dulac C. (2016) New perspectives on genomic imprinting, an essential and multifaceted mode of epigenetic control in the developing and adult brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 39, 347–384.
- Schulz R., McCole R.B., Woodfine K., Wood A.J., Chahal M., Monk D., Moore G.E., Oakey R.J. (2009) Transcript- and tissue-specific imprinting of a tumour suppressor gene. *Hum. Mol. Genet.* 18(1), 118–127.

- Thamban T., Sowpati D.T., Pai V., Nithianandam V., Abe T., Shioi G., Mishra R.K., Khosla S. (2019) The putative neuronatin imprint control region is an enhancer that also regulates the *Blcap* gene. *Epigenomics*. 11(3), 251–266.
- Zhou Y., Zhang X., Klibanski A. (2012) *MEG3* noncoding RNA: a tumor suppressor. *J. Mol. Endocrinol.* 48(3), R45–R53.
- 62. Lopez S.J., Segal D.J., La Salle J.M. (2019) *UBE3A*: An E3 ubiquitin ligase with genome-wide impact in neuro-developmental disease. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, e476.
- 63. Mishra A., Jana N.R. (2008) Regulation of turnover of tumor suppressor p53 and cell growth by E6-AP, a ubiquitin protein ligase mutated in Angelman mental retardation syndrome. *Cell Mol. Life Sci.* **65**(4), 656–666.
- 64. Chiavegatto S., Sauce B., Ambar G., Cheverud J.M., Peripato A.C. (2012) Hypothalamic expression of *Peg3* gene is associated with maternal care differences between SM/J and LG/J mouse strains. *Brain Behav.* 2(4), 365–376.
- Ineson J., Stayner C., Hazlett J., Slobbe L. (2012) Somatic reactivation of expression of the silent maternal *Mest* allele and acquisition of normal reproductive behavior in a colony of *Peg1/Mest* mutant mice. *J. Reprod.* 58(4), 490–500.
- 66. Keverne E.B. (2011) Epigenetics and brain evolution. *Epigenomics.* **3**(2), 183–191.
- 67. Tunster S.J., Creeth H.D., John R.M. (2016) The imprinted *Phlda2* gene modulates a major endocrine compartment of the placenta to regulate placental demands for maternal resources. *Dev. Biol.* **409**(1), 251–260.
- Creeth H.D., McNamara G.I., Tunster S.J., Boque-Sastre R., Allen B., Sumption L., Eddy J.B., Isles A.R., John R.M. (2018) Maternal care boosted by paternal imprinting in mammals. *PLoS Biol.* 16(7), e2006599.
- 69. Monk D., Arnaud P., Frost J., Hills F.A., Stanier P., Feil R., Moore G.E. (2009) Reciprocal imprinting of human *GRB10* in placental trophoblast and brain: evolutionary conservation of reversed allelic expression. *Hum. Mol. Genet.* **15**(18), 3066–3074.
- Garfield A.S., Cowley M., Smith F.M., Moorwood K., Stewart-Cox J.E., Gilroy K., Baker S., Xia J., Dalley J.W., Hurst L.D., Wilkinson L.S., Isles A.R., Ward A. (2011) Distinct physiological and behavioural functions for parental alleles of imprinted *Grb10. Nature*. 469(7331), 534–538.
- Rienecker K.D., Chavasse A.T., Moorwood K., Ward A., Isles A.R. (2020) Detailed analysis of paternal knockout *Grb10* mice suggests effects on stability of social behavior, rather than social dominance. *Genes Brain Behav.* 19(1), e12571.
- 72. Portmann-Lanz C.B., Schoeberlein A., Portmann R., Mohr S., Rollini P., Sager R., Surbek D.V. (2010) Turning placenta into brain: placental mesenchymal stem cells differentiate into neurons and oligodendrocytes. Am. J. Obstet. Gynecol. 202(3), 294.e1–294.e11.
- 73. Keverne E.B. (2014) Significance of epigenetics for understanding brain development, brain evolution and behavior. *Neuroscience*. **4**(264), 207–217.
- 74. Chen X.Y., Xue Y., Wang H., Zhu S.H., Hao X.M., Chen L. (2013) Modulation of firing activity by endogenous GABAA receptors in the globus pallidus of

18

MPTP-treated parkinsonian mice. *Neurosci. Bull.* **29**(6), 701–707.

- Kono T. (2006) Genomic imprinting is a barrier to parthenogenesis in mammals. *Cytogenet. Genome Res.* 113, 31–35.
- Weisstein A.E., Feldman M.W., Spencer H.G. (2002) Evolutionary genetic models of the ovarian time bomb hypothesis for the evolution of genomic imprinting. *Genetics.* 162, 425–439.
- Varmuza S., Mann M. (1994) Genomic imprinting defusing the ovarian time bomb. *Trends. Genet.* 10(4), 118–123.
- Barlow D.P. (1993) Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation. *Science*. 260, 309–310.
- 79. Roberts R.M., Green J.A., Schulz L.C. (2016). The evolution of the placenta. *Reproduction*. **152**, R179–R189.
- Ono R.I., Nakamura K., Inoue K., Naruse M., Usami T., Wakisaka-Saito N., Hino T., Suzuki-Migishima R., Ogonuki N., Miki H., Kohda T., Ogura A., Yokoyama M., Kaneko-Ishino T., Ishino F. (2006) Deletion of *Peg10*, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat. Genet.* 38(1), 101–106.
- 81. Henke C., Strissel P.L., Schubert M.T., Mitchell M., Stolt C.C., Faschingbauer F., Beckmann M.W., Strick R.

(2015) Selective expression of sense and antisense transcripts of the Sushi-ichi-related retrotransposon-derived family during mouse placentogenesis. *Retrovirology*. **12**, e9.

- Kitazawa M., Tamura M., Kaneko-Ishino T., Ishino F. (2017) Severe damage to the placental fetal capillary network causes mid- to late fetal lethality and reduction in placental size in Peg11/Rt11 KO mice. *Genes Cells*. 22(2), 174–188.
- Haig D., Graham C. (1991) Genomic imprinting and the strange case of the insulin-like growth factor II receptor. *Cell.* 64, 1045–1046.
- 84. Haig D. (2004) Evolutionary conflicts in pregnancy and calcium metabolism a review. *Placenta*. **25**, 10–15.
- 85. Xiong Y., Mei W., Kim E.D., Mukherjee K., Hassanein H., Barbazuk W.B., Sung S., Kolaczkowski B., Kang B.H. (2014) Adaptive expansion of the maize maternally expressed gene (*Meg*) family involves changes in expression patterns and protein secondary structures of its members. *BMC Plant Biol.* 14, e204.
- Lan Y., Liu X., Fu Y., Huang S. (2018) *Arabidopsis* class I formins control membrane-originated actin polymerization at pollen tube tips. *PLoS Genet.* 14(11), e1007789.

EVOLUTIONARY PERSPECTIVES OF GENOMIC IMPRINTING

E. A. Sazhenova^{1, *} and I. N. Lebedev¹

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: elena.sazhenova@medgenetics.ru

Genomic imprinting is an epigenetic phenomenon that differentiates maternal and paternal copies of genes in the genome and provides their monoallelic expression depending on parental origin. Imprinting is an evolutionary puzzle, as it bears the costs of diploidization, abandoning its advantages in the form of protection from recessive mutations. The aim of this review is to answer the question why genomic imprinting arose and became fixed in the evolution of angiosperms, insects, marsupials and placental mammals.

Keywords: genomic imprinting, eukaryotes, evolution, DNA methylation, placenta, brain

Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR, project number 19-14-50333.

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 577.218

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ У ПРОКАРИОТ

© 2021 г. А. О. Михайлина^{а, *}, Е. Ю. Никонова^а, О. С. Костарева^а, С. В. Тищенко^а

^аИнститут белка Российской академии наук, Пущино, Московская обл., 142290 Россия *e-mail: alisamikhaylina15@gmail.com Поступила в редакцию 17.06.2020 г. После доработки 12.07.2020 г.

Принята к публикации 20.07.2020 г.

Биосинтез белка, проходящий на рибосомах, считается основным процессом в жизни клетки. В сбалансированном синтезе белков и РНК в биогенезе рибосом важную роль играет регуляция экспрессии генов рибосомных белков. В представленном обзоре рассмотрены некоторые особенности процессов авторегуляции синтеза рибосомных белков у прокариот. Обсуждаются также механизмы ингибирования синтеза рибосомных белков, кодируемых 12 оперонами, такие как конкурентное ингибирование, механизмы "ловушки" и ретрорегуляции. Приведены примеры регуляции синтеза белков как индивидуальными рибосомными белками, так и их комплексами.

Ключевые слова: регуляция экспрессии, оперон, рибосомные белки, мРНК **DOI:** 10.31857/S0026898421010110

введение

Регуляция синтеза рибосомных белков в клетках Escherichia coli была открыта более 40 лет назад и за это время хорошо изучена. Гены белков у прокариот, как правило, организованы в функциональные единицы – опероны, которые находятся под контролем оператора. В состав оперонов генов рибосомных белков (р-белков) могут вхолить и гены нерибосомных белков. Так. v E. coli это гены, кодирующие компоненты репликационного комплекса (dnaG – праймаза, priB – праймосомный белок N), субъединицы РНК-полимеразы (rpoA, rpoB, rpoC, rpoD), факторы трансляции (tsf, fus, tufA), гены, продукты которых участвуют в созревании pPHK (*rimM*), в процессинге (*trmD*) и модификации (*rnpA*) тРНК и экспорте белков через мембрану (secY). Для биогенеза рибосом требуется приблизительно эквимолярное количество рбелков и рРНК. Многие р-белки прокариот регулируют экспрессию как своих собственных генов, так и генов других белков своего оперона (рис. 1). К белкам-регуляторам относятся как белки малой (Small) рибосомной субчастицы (S1, S4, S7, S8, S15 и S20), так и большой (Large) субчастицы (L1, L4, L10, L12, L20).

Основной принцип регуляции синтеза р-белков — принцип обратной связи, когда один из рбелков, кодируемых опероном, при его избыточном синтезе действует как репрессор трансляции мРНК всего оперона. Причем оператор может находиться как выше первого гена, так и между генами оперона. Участки связывания на мРНК некоторых белков-репрессоров гомологичны участкам связывания этих белков на рРНК, однако, многие р-белки регулируют синтез белков, связываясь с участком мРНК, не имеющим явной гомологии со специфическим участком на рРНК.

Авторегуляция синтеза р-белков может осуществляться по различным механизмам. Механизм конкурентного ингибирования предполагает конкуренцию между специфическими участками связывания белка-регулятора на мРНК и рРНК. При регуляции по механизму "ловушки" взаимодействие белка-репрессора с мРНК приводит к формированию структур, затрудняющих инициацию трансляции мРНК. Механизм ретрорегуляции подразумевает дестабилизацию мРНК при взаимодействии с белком-репрессором. Кроме того, регуляция может осуществляться как одиночными белками, так и их комплексами.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ КОНКУРЕНТНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ

Конкурентный механизм авторегуляции синтеза р-белков предполагает конкуренцию мРНК и рРНК за связывание с белком-репрессором.

Сокращения: 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область; р-белки – рибосомные белки; SD – последовательность Шайна– Дальгарно.



Рис. 1. Организация генов р-белков *E. coli* в оперонах. Белки-репрессоры показаны окружностями; участки мРНК, с которыми они взаимодействуют, обозначены символом \bot . Гены, экспрессия которых регулируется белком-репрессором, обозначены белым цветом; гены, которые не регулируются соответствующим р-белком, выделены серым цветом. Р – промоторы; t и att – терминатор транскрипции и аттенюатор соответственно. *a* – S10-оперон. *b* – L11-оперон. *e* – S1-оперон. *c* – S2-оперон. *d* – L20-оперон. *e* – S6-оперон. *ж* – L10-оперон. *s* – S15-оперон. *u* – S4/ α -оперон. *к* – S8/*spc*-оперон. *л* – S7/*str*-оперон. *м* – S20-оперон.

Как правило, сродство репрессора к мРНК значительно ниже, чем к рРНК.

S10-оперон

Экспрессия S10-оперона *E. coli*, содержащего гены 11 р-белков, контролируется р-белком L4 (рис. 1*a*) [1]. L4 регулирует как трансляцию, так и транскрипцию генов своего оперона [2].

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

В бактериальной рибосоме L4 связывается в основном с доменом I 23S pPHK, а его протяженная петля формирует часть туннеля выхода полипептида [3]. Считается, что С-концевая часть белка отвечает за регуляторные свойства, а центральный участок необходим для встраивания в рибосому [4].

Участки связывания белка L4 на 23S рРНК и мРНК не имеют явного сходства (рис. 2) [5]. Ос-



Рис. 2. Вторичная структура участков связывания белка L4 на PHK в *E. coli. a* – 5'-HTO гена белка S10 (*rpsJ*). Голубым выделены нуклеотиды терминатора транскрипции; последовательность SD и старт-кодон *rpsJ* – зеленым. Минимальный фрагмент мPHK, обладающий высоким сродством к белку L4, выделен штриховой рамкой. *б* – Минимальный фрагмент 23S pPHK, специфически связывающийся с белками L4 и L24. Красным выделены участки, с которыми вза-имодействует белок L4.

новной участок взаимодействия белка L4 с 23S рРНК – это место пересечения четырех спиралей, содержащее петлевой участок (рис. 26) [6]. Участок мРНК S10-оперона, связавшись с которым белок L4 осуществляет контроль синтеза белков S10-оперона как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции, находится в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) первого гена оперона *rpsJ* и содержит шпильки HD–HG (рис. 2*a*).

Известно, что участки мРНК S10-оперона Е. соli, отвечающие за терминацию транскрипции и ингибирование трансляции, частично перекрываются, но не идентичны [7, 8]. 5'-НТО оперона содержит шесть шпилек (рис. 2а), однако первые три шпильки несущественны для регуляции экспрессии оперона in vivo. Шпильки HD и HE необходимы для контроля транскрипции, а для контроля трансляции наиболее важны шпильки HE и HG [7, 9, 10]. Шпилька НЕ и расположенная за ней уридин-богатая последовательность образуют сайт ρ-независимого терминатора транскрипции. Минимальный фрагмент мРНК S10-оперона E. coli, обладающий высоким сродством к белку L4, содержит шпильку HD и часть шпильки HE [5]. На основании биоинформатического анализа предсказана консервативная структура регуляторного

участка мРНК S10-оперона [11]. Предполагается, что основным участком связывания L4 является петля шпильки HD и консервативные неспаренные нуклеотиды, фланкирующие эту шпильку (рис. 2*a*) [12].

Регуляция транскрипции осуществляется в результате взаимодействия белка L4 с 5'-НТО мРНК, фактором транскрипции NusA и PHK-полимеразой [1]. Белок L4, взаимодействуя с NusA, увеличивает время паузы РНК-полимеразы на терминаторном сайте шпильки НЕ, что приводит к преждевременной терминации транскрипции [13–15].

У некоторых бактерий L4-опосредованная регуляция отсутствует. Так, белок L4 *Pseudomonas aeruginosa* не ингибирует синтез белков своего оперона, и в области 5'-НТО мРНК белка S10 отсутствуют детерминанты, похожие на участок связывания этого белка в *E. coli*. Оперон *P. aeruginosa*, несущий ген белка L4, содержит также ген белка L24, а область в районе 5'-НТО мРНК гена *rplC* похожа на участок связывания этих белков в рибосоме. В связи с этим предполагается, что в регуляции S10-оперона *P. aeruginosa* участвуют оба белка – L4 и L24. По-видимому, возможные



Рис. 3. Организация генов L11-оперона у бактерий и L1-оперона архей. Белок-репрессор обозначен окружностью, участки мРНК, с которыми он взаимодействует, показаны символом [⊥].

механизмы регуляции этого оперона отличаются у разных организмов [16].

S10-подобный оперон археи Methanocaldococcus jannaschii кодирует не 11, как у E. coli, а пять генов р-белков (L3, L4, L23, L2, S19), первым геном этого оперона является ген белка L3, а не S10. Синтез белков этого оперона у M. jannaschii также регулируется белком L4. L4-связывающий участок включает 5'-НТО и начало кодирующей части мРНК белка L3 [17].

L11-оперон

Консервативный двухдоменный р-белок L1 регулирует трансляцию мРНК L11-оперона бактерий. Этот белок участвует в формировании L1-выступа 50S субчастицы рибосомы, прочно и специфически связываясь с 23S рРНК в районе спиралей 76–78. При недостатке 23S рРНК белок L1 связывается со специфическим участком мРНК своего оперона и препятствует ее трансляции. Подробно изучена регуляция L11-оперона *E. coli* [18–20] и L1-оперона архей рода *Methanocaldococcus* [21, 22].

Участок связывания белка L1 на мРНК L11оперона *E. coli* располагается в 5'-НТО мРНК белка L11 (рис. 3). Сопряженность трансляции генов оперона приводит к сопряжению репрессии трансляции [23, 24]. У архей *M. vannielii* и *M. jannaschii* участок связывания белка L1 находится в 5'-НТО его собственной мРНК (рис. 3). Авторегуляция синтеза белка L1 *M. vannielii* происходит либо до формирования первой пептидной связи L1, либо на этой стадии [25].

Поиск участков связывания белка L1 на мРНК различных бактерий показал, что положение L1связывающего сайта не строго консервативно [11]. В бактериях одних групп эти сайты располагаются перед геном белка L11 (Proteobacteria, Spirochaetes, Thermotogae и Tenericutes), в других – перед геном белка L1 (Cyanobacteria, Actinobacteria и Chloroflexi), а в 40% геномов Firmicute участки связывания белка L1 обнаружены перед обоими генами (рис. 3). Недавно на мРНК L11-оперона *Thermotoga maritima* найдены два L1-регуляторных участка: первый в 5'-НТО мРНК белка L11, как в *E. coli*, а второй включает лидерный и кодирующий участки мРНК белка L1 [26].

Структуры участков связывания белка L1 на рРНК консервативны во всех доменах жизни [27, 28]. Сайты связывания белка L1 на мРНК имеют высокую гомологию первичной и вторичной структуры с его участком связывания на рРНК [22, 29] (рис. 4). Однако константы связывания белка L1 с рРНК и мРНК отличаются примерно на порядок, в результате чего регуляция трансляции L11-оперона осуществляется по классическому принципу обратной связи [24].

Поскольку участки связывания белка L1 на мРНК и рРНК гомологичны у бактерий и архей (рис. 4), L1 археи *M. vannielii* способен функционально замещать белок L1 *E. coli* как в составе ри-



Рис. 4. Участки связывания белка L1 на 23S рРНК (*T. thermophilus*) и мРНК (*E. coli* и *M. jannaschii*). На фрагментах РНК красным выделены нуклеотиды, образующие консервативные контакты с белком L1.

босомы, так и в качестве репрессора трансляции, a L1 *E. coli* ингибирует трансляцию мРНК L1-оперона *M. vannielii in vitro* [22, 30]. Белок L1 бактерии *T. thermophilus* способен регулировать синтез белков L1-оперона археи *M. vannielii in vitro* [31].

Структурные и биохимические исследования свидетельствуют о ведущей роли домена I белка L1 во взаимодействии с РНК в бактериях [31–33] и археях [34].

S1-оперон

Р-белок S1, кодируемый геном *rpsA*, регулирует свой собственный синтез на уровне трансляции (рис. 1*в*) [35, 36]. S1 — один из белков малой рибосомной субчастицы, расположен между головкой и платформой 30S субчастицы и контактирует с мРНК, р-белками [37, 38] и РНК-полимеразой [39, 40].

Известно, что белок S1 необходим для трансляции некоторых мРНК [35], включая свою собственную [41]. Белок содержит шесть доменов. Три N-концевых домена (D1-D3) взаимодействуют с р-белками, а также с различными мРНК в составе рибосомы и обладают РНК-шаперонной активностью [42]. Эти домены участвуют в формировании преинициаторного комплекса 30S рибосомной субчастицы с мРНК. С-концевые домены D3-D6 обеспечивают специфичность узнавания одноцепочечных участков различных мРНК [43, 44]. Известно, что участок связывания белка S1 на его мРНК находится в 5'-НТО, он образован тремя шпильками (I-III), разделенными AU-богатыми одноцепочечными участками (ss1 и ss2) (рис. 5*a*). Шпилька III содержит старт-кодон и SD-подобный элемент (GAAG) (рис. 5a), формирующий только три комплементарные пары оснований с анти-SD 16S pPHK [45]. Тем не менее, S1-оперон — один из наиболее сильных оперонов в E. coli с эффективным отрицательным аvтогенным контролем [36]. Последовательности GG(A) в петлях шпилек I и II мРНК совместно со слабой SD могут образовывать разделенный в пространстве общий SD-элемент (рис. 56) [35]. Регуляция синтеза белка S1 происходит на уровне формирования 30S преинициаторного комплекса. Так. 30S рибосомная субчастица без белка S1 не способна образовывать преинициаторный комплекс со своей мРНК in vitro. Добавление белка S1 к 30S



Рис. 5. Регуляторный участок мРНК *rpsA. a* – Вторичная структура участка инициации трансляции белка S1 на мРНК *rpsA*. Серым отмечены консервативные нуклеотиды GG. Рамкой выделена SD-последовательность. *б* – Схема ауто-генной регуляции синтеза белка S1.



Рис. 6. Вторичная структура 5'-НТО мРНК *rpsB E. coli*. LH и RH – консервативные шпилечно-петельные структуры, CR – центральный, слабоструктурированный участок. Консервативные нуклеотиды выделены красным.

субчастицам с дефицитом S1 в молярном соотношении 1 : 1 восстанавливает их способность связывать мРНК *rpsA*, тогда как избыток белка ингибирует это связывание (рис. 56).

Белок S1 взаимодействует с одноцепочечными участками ss-1 и ss-2 на мРНК *rpsA* (рис. 5*a*). Это взаимодействие изменяет структуру участка инициации трансляции *rpsA*, нарушая его активную конформацию, и предотвращает формирование преинициаторного комплекса с 30S субчастицей [35] (рис. 5*б*).

Вторичная структура 5'-НТО мРНК *rpsA* сходна в пяти семействах γ-протеобактерий (Enterobacteriaceae, Pasterellaceae, Vibrionaceae, Erwiniaceae, Shewanellaceae) [45]. Спирали II и III довольно консервативны, межспиральный участок, как правило, содержит AU-богатую последовательность [11]. Слабая спираль III всегда содержит SD-подобный элемент и AUG в петле, а в петлях шпилек I и II имеются триплеты GGA (рис. 5*a*).

S2-оперон

S2-оперон (оперон *rpsB*—*tsf*) бактерий кодирует р-белок S2 и фактор элонгации Ts (рис. 1*г*). В клетках *E. coli* регуляция этого оперона осуществляется на уровне трансляции белком S2 [46].

Глобулярный домен белка S2 взаимодействует с "телом" 30S субчастицы рибосомы, а двухцепочечный домен направлен к "головке" малой субчастицы. Показано, что белок S2 на рибосоме участвует в связывании SD на этапе инициации трансляции [47]. Гомологии S2-связывающего участка на мРНК и на 16S рРНК (h26 и h35—h37) [48] не обнаружено. Регуляторный участок, с которым взаимодействует белок S2, находится в 5'-НТО мРНК *rpsB*. Наиболее важны для регуляции участки CR и RH мРНК *rpsB* (рис. 6). Интересно, что белок S2 более эффективно регулирует экспрессию *rpsBlacZ* в присутствии белка S1 [46]. Белок S2 требуется для встраивания S1 в рибосому [40] и может образовывать комплекс с S1.

Удлиненный последовательностью TGTG "-10"промотор гена *rpsB* и вторичная структура 5'-HTO мРНК rpsB консервативны у ү-протеобактерий [49]. Ген tsf не имеет своего промотора, и EF-Ts синтезируется с бицистронной мРНК rpsB-tsf [50, 51]. Гены разделены протяженным участком, содержащим инвертированные повторы, за которыми следует аттенюатор [52]. При связывании белка S2 с участком мРНК *rpsB* синтез EF-Ts также ингибируется [46]. Активность промотора S2-оперона снижается при аминокислотном голодании in vivo или при увеличении концентрации алармона ppGpp in vitro. Для этой регуляции важна GC-богатая нуклеотидная последовательность, отделяющая "-10"-элемент от старта транскрипции [49].

Таким образом, регуляция синтеза белков S2 и EF-Ts осуществляется как белком S2 на уровне трансляции по принципу обратной связи, так и на уровне транскрипции – глобальным регулятором ppGpp. Причем для эффективной и регулируемой транскрипции S2-оперона необходимо сочетание всех консервативных элементов промотора *rpsB* [49].

L20-оперон

L20-оперон (оперон rpmI-rplT) включает гены р-белков L35 (rpmI) и L20 (rplT), и фактора инициации трансляции 3 – IF3 (infC) (рис. 1d). Белок



Рис. 7. Вторичная структура трех L20-связывающих сайтов на PHK. Консервативные нуклеотиды на всех участках выделены красным. *a* – Участок *infC-rpmI* мPHK *E. coli*. *б* – Первый сайт связывания L20 с мPHK – псевдоузел, в котором спираль S2 образуется удаленными друг от друга участками мPHK (показано сходящимися стрелками). *в* – Второй L20-связывающий сайт на мPHK. Рамками выделены старт-кодон гена *rpmI* и стоп-кодон *infC. г* – L20-связывающий сайт на 23S pPHK *E. coli*.

L20 прямо ингибирует трансляцию цистрона L35 и сопряженно – трансляцию своего собственного цистрона [53]. Это первично связывающийся с рРНК белок 50S субчастицы [54], взаимодействующий с участком между спиралями 40 и 41 23S рРНК.

Для репрессии трансляции L20-оперона *in vivo* достаточно С-концевого домена белка [55]. В межцистронной области *infC-rpmI* мРНК *E. coli* обнаружены два регуляторных сайта, с которыми L20 взаимодействует с одинаковым сродством (рис. 7). Первый сайт включает псевдоузел, сфор-

мированный участками *infC* и *rpmI* (рис. 7*a*, *b*) [55] и способствующий сопряжению трансляции IF3 и цистронов р-белков [56]. Второй сайт (рис. 7*a*, *b*) содержит центральную часть спирали t1, структура которой похожа на сайт связывания белка L20 на 23S рРНК (рис. 7*c*) [57]. Наличие двух L20-связывающих сайтов подтверждено *in vivo* мутационным анализом мРНК L20-оперона [58]. Эти участки находятся вблизи псевдоузла, образуя один участок в трехмерной структуре оператора. Минимальный участок мРНК, необходимый для



Рис. 8. Предполагаемая модель регуляции генов *rpmI–rpIT* белком L20. Участки мРНК, формирующие псевдоузел – шпилька S1 мРНК *infC* и участок 5'-НТО мРНК *rpmI*, формирующий спираль S2, выделены синим. Шпилька t1 мРНК *infC* показана фиолетовым. Желтым обозначен участок гена *rpmI*, зеленым овалом – р-белок L20.

репрессии трансляции, включает псевдоузел и нижние 2/3 спирали t1 (рис. 7) [55, 58].

Предполагается, что белок L20 регулирует синтез белков своего оперона по механизму конкуренции между репрессором и рибосомой за связывание с мРНК [59]. При транскрипции оператора *гртI* сначала синтезируется шпилька S1 мРНК (показана синим на рис. 8, шаг 1), затем шпилька t1 (показана фиолетовым на рис. 8, шаг 1). После формирования шпильки мРНК белок L20 прочно связывается с участком на этой шпильке (рис. 8, шаг 2). Далее синтезируется участок мРНК, соответствующий 3'-концу шпильки S2 (рис. 8, шаг 3, линейный участок 3'-конца мРНК показан синим), что приводит к формированию псевдоузла (рис. 8, шаг 4). После того, как операторный участок принял необходимую конформацию, связавшаяся ранее молекула белка L20 меняет свое положение на мРНК (рис. 8, шаг 5), блокируя участок взаимодействия с рибосомой. Предполагается, что взаимодействие L20 со шпилькой t1 мРНК позволяет временно увеличивать локальную концентрацию белка L20 вблизи мРНК до тех пор, пока не сформируется псевдоузел мРНК. Структура комплекса L20 с операторной частью мРНК к настоящему времени неизвестна, однако показано, что белок связывается с этой областью с молярным соотношением 1:1 [59].

В *B. subtilis* найден только один участок, с которым взаимодействует белок L20, и он отличается от регуляторного участка в *E. coli*. Эта область находится в 5'-НТО мРНК *infC*, а регуляция осуществляется на уровне транскрипции, но не трансляции. Тем не менее, данный участок мРНК также имеет сходство с L20-связывающим сайтом 23S pPHK *B. subtilis* [60]. Таким образом, несмотря на отличие в структурах L20-связывающих участков PHK у разных организмов, белок имеет схожие детерминанты для взаимодействия на мРНК и pPHK.

S6-оперон

В геномах многих видов бактерий ген rpsF, кодирующий р-белок S6, локализован рядом с генами priB (компонент праймосомы) и rpsR (р-белок S18) (рис. 1е). S6-оперон (rpsF-оперон) Е. coli включает также ген rplI (р-белок L9) [61]. Белки S6 и S18 не относятся к первично-связывающимся с рРНК белкам, они формируют гетеродимер, взаимодействующий с участком 16S pPHK, связанным с р-белком S15 [62-64]. Нуклеотиды ССК (R = A/G) в 16S рРНК – единственный консервативный участок, специфически взаимодействующий с комплексом S6·S18 (рис. 9б). Аналогичная последовательность обнаруживается и в S6·S18связывающем сайте на мРНК rpsF (рис. 9a), что указывает на ключевую роль этого элемента во взаимодействии белкового комплекса с РНК [65], причем сродство S6·S18 к рРНК выше, чем к мРНК [66].



Рис. 9. Вторичная структура S6·S18-связывающих участков РНК. *а* – Предположительная вторичная структура участка мРНК *rpsF E. coli*. Последовательность SD выделена зеленым. *б* – Фрагмент 16S рРНК *T. thermophilus*. Рамками выделены нуклеотиды, образующие S6·S18-связывающий сайт, красным – консервативный ССR-мотив.

РНК-белковые контакты в рибосомном и регуляторном комплексах S6·S18 консервативны. Замены аминокислотных остатков в белке \$18, которые приводят к потере сродства белка к рРНК. ослабляют и его взаимодействие с мРНК [65, 67]. Мутации, нарушающие белок-белковые контакты в комплексе S6·S18, также приводят к снижению уровня регуляции синтеза белков S6-оперона [63, 67]. Анализ 5'-НТО S6-оперона v у-протеобактерий, Firmicutes и Tenericutes показал, что CCR-мотив входит в состав петли консервативной шпильки Р1 мРНК [65], на 3'-конце которой находится SD (рис. 9а). В модели комплекса с мРНК белок S6, взаимодействующий в рибосоме с малым желобком h22 и h23b pPHK, образует связи со спиралью Р1. Белок S18 может также контактировать со спиралью Р1 и с ССКмотивом (рис. 9а).

Связывание S6·S18 с мРНК стабилизирует ее структуру, делая SD недоступным для взаимодействия с рибосомой и ингибируя трансляцию мРНК S6-оперона по принципу обратной связи. Мутационный анализ показал, что последовательность спирали P1 мРНК *rpsF* важна для эффективности трансляции как в клетках *E. coli*, так и у *B. subtilis* [66, 67], однако белок S18 *B. subtilis* имеет слабое сродство к мРНК в отсутствие белка S6 [66].

L10-оперон

L10-оперон (*rplJL*-оперон) *E. coli* содержит гены р-белков L10 (*rplJ*) и L12 (*rplL*) и β-, β'-субчастиц РНК-полимеразы (рис. 1*ж*). В результате аттенюации транскрипции и процессинга мРНК *rplJL* образуются два отдельных транскрипта, один из которых содержит цистроны р-белков, а второй — цистроны субъединиц РНК-полимеразы. Трансляция цистронов *rplL* и *rplJ* сопряжена [23] и регулируется по принципу конкурентного ингибирования комплексом, состоящим из одной молекулы белка L10 и четырех молекул L12 (L10·(L12)₄) [68–72].

У представителей семи родов энтеробактерий, включая *E. coli*, гены *rplKAJL* разделены на два оперона: L11 (*rplKA*) – регулируется белком L1, и L10 (*rplJL*) – регулируется белком L10 [23, 24]. У архебактерий гены *rplAJL* транскрибируются в виде трицистронной мРНК, трансляция которой регулируется белком L1 [73].



Рис. 10. Вторичная структура L10·(L12)₄-связывающих сайтов РНК *E. coli. а* – Вторичная структура L10·(L12)₄-связывающего сайта мРНК *rplJL. б* – Вторичная структура L10·(L12)₄-связывающего участка 23S рРНК. Красным показаны L10·(L12)₄-связывающие участки. Старт-кодон мРНК *rplJ* выделен зеленым.



Рис. 11. Схемы регуляции экспрессии мРНК *rplJL. а* – Модель координированной экспрессии трансляции мРНК *rplJL E. coli*. Последовательности SD обозначены зеленым. *б* – Модель аутогенной аттенюации транскрипции L10оперона *B. subtilis*. Серым квадратом обозначен участок терминации. Нуклеотидные остатки, переходящие между шпильками AT и AAT выделены желтым, между шпильками AT и T – голубым. Зеленым обозначены SD гена, кодирующего лидерный пептид и *rplJ*. Консервативный мотив "излом-поворот", с которым взаимодействует комплекс L10(L12)₄, выделен красным.

Белок L12 на рибосоме взаимодействует только с белком L10, не связывается с pPHK, и не может самостоятельно регулировать трансляцию [23, 74]. Это единственный р-белок, который представлен на рибосоме в нескольких копиях. В *E. coli* и других мезофильных бактериях образуется пентамерный комплекс L10·(L12)₄, тогда как термофильные бактерии содержат гептамерный комплекс L10·(L12)₆ [75–77].

Основной вклад в узнавание белка L10 на рибосоме вносит консенсусный мотив "излом-поворот" (H42-44 23S pPHK) в районе GTPазного центра (рис. 10*б*) [57, 78], похожий на L10-связывающий участок мPHK *rplJ E. coli* (рис. 10*a*) [79]. Важную роль во взаимодействии с белком играет вторичная структура мPHK, удаление любого участка этой спирали снижает эффективность регуляции [80, 81]. Известно, что в связывании многих р-белков с PHK ведущую роль играют неспаренные нуклеотиды и выпетливания [82-86].

Показано, что два консервативных аденина в выпетливании UUAA мРНК защищаются комплексом L10·(L12)₄ от химических реагентов (рис. 10*a*) [87]. У всех организмов выпетливание находится на расстоянии 4 п.н. от консенсусного мотива "излом-поворот". Консервативная петля UAA 23S рРНК имеет такое же расположение относительно мотива "излом-поворот", как и консервативные аденины в выпетливании мРНК (рис. 10) [79]. Замены этих аденинов как в мРНК, так и в рРНК, снижают сродство $L10\cdot(L12)_4$ к РНК.

Модель регуляции L10-оперона основана на возможности существования двух альтернативных конформаций 5'-НТО мРНК *rplJ*. Предполагается, что регуляция оперона осуществляется в результате конкуренции рибосомы с репрессором за связывание с мРНК в "открытой" или "закрытой" конформации (рис. 11*a*). Связывание L10(L12)₄ приводит к изменению вторичной структуры мРНК – формируется двойная спираль между SD цистрона *rplL* и 5'-проксимальным участком мРНК и образуется "закрытая" конформация мРНК (SD недоступна) [88] (рис. 11*a*). Такая структура может стать мишенью для РНКаз, специфичных к двухцепочечным РНК (РНКаза III), что приводит к снижению стабильности мРНК.

Регуляция синтеза мРНК *rplJL B. subtilis* проходит по механизму аттенюации транскрипции [89, 90]. Лидерный участок этой мРНК содержит три перекрывающиеся шпильки. Внутренний теминатор транскрипции и находящаяся перед ним шпилька АТ действуют как антитерминатор транскрипции, а расположенная выше структура ААТ, работает как анти-антитерминатор (рис. 11*6*). L10(L12)₄ *B. subtilis* стабилизирует ААТ-шпильку

мРНК (рис. 11б), предотвращая образование АТшпильки и обеспечивая терминацию транскрипции. Лидерный участок мРНК rplJL B. subtilis кодирует лидерный пептид, SD которого находится с 3'-конца терминаторной шпильки (рис. 11б). Трансляция лидерного пептида может увеличивать экспрессию rplJL B. subtilis за счет блокирования доступности транскрипта для о-фактора. Таким образом, L10-оперон B. subtilis регулируется как по механизму аттенюации, так и по механизму антитерминации, осуществляемой лидерным пептидом. Такой двойной посттранскрипционный контроль может обеспечить тонкую настройку экспрессии rplJL B. subtilis в зависимости от фазы роста клеток. Аналогичная структура лидерного участка rplJL, включающего последовательность лидерного пептида, обнаружена и у других видов *Bacillus* [89].

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ПО МЕХАНИЗМУ "ЛОВУШКИ"

Механизм регуляции синтеза р-белков по принципу "ловушки" предполагает формирование "неактивной" структуры мРНК при связывании белка-репрессора, что блокирует рибосому на преинициаторной стадии. Наиболее хорошо изучена авторегуляция по механизму "ловушки" синтеза р-белка S15 *E. coli*. Предполагается, что механизм "ловушки" действует при более низком сродстве белка к мРНК, чем при конкурентном механизме, так как репрессору нужно только стабилизировать непродуктивный инициаторный комплекс, тогда как при конкурентном механизме репрессор и рибосома должны конкурировать за связывание с мРНК [91].

S15-оперон

S15-оперон состоит из двух генов – *rpsO* (кодирует р-белок S15) и pnp (кодирует полинуклеотидфосфорилазу). В Е. coli эти два гена котранскрибируются. При избыточном синтезе S15 ингибирует трансляцию своей мРНК. Оперон содержит два промотора: P1 — перед геном rpsO, и слабый промотор P2 – между генами rpsO и pnp (рис. 13). Кроме того, в участке между генами есть последовательность, образующая р-независимый терминатор, а в области ниже Р2 – шпилька, содержащая участок узнавания РНКазой III (рис. 13) [92]. При разрушении этой шпильки образуется дуплексная структура с неупорядоченной З'-концевой частью, которая расщепляется самой полинуклеотидфосфорилазой, что приводит к дестабилизации мРНК рпр. Таким образом, полинуклеотидфосфорилаза регулирует свой синтез на посттранскрипционном уровне РНКаза III-зависимым путем [93].

Однодоменный белок S15 взаимодействует с 16S рРНК в двух местах (рис. 12*a*), играя основ-

ную роль в сборке центрального домена 30S субчастицы рибосомы [63]. Основной сайт связывания белка сформирован спиралями 20–22 16S рРНК и узлом GGC в месте их сочленения. Другой сайт представляет собой консервативный мотив G·U/G-C, расположенный на расстоянии одного витка спирали от места пересечения трех спиралей.

5'-НТО мРНК rpsO в отличие от S15-связывающего участка на рРНК имеет неконсервативную структуру. Различия между гомологами белка в E. coli (мРНК_{Есо}, EcoS15), Geobacillus kaustophilus (MPHK_{Gka}, GkaS15), T. thermophilus (MPHK_{Tth.} TthS15) и Rhizobium radiobacter (мРНК_{Rra}) обуславливают специфичность узнавания различных структур мРНК этих организмов (рис. 126-д). Таким образом, даже консервативные РНК-связывающие белки разных бактерий могут иметь отличающиеся РНК-узнающие модули, что свидетельствует о коэволюции бактериальных гомологов белка S15 и специфических участков на мРНК. Не все мРНК rpsO регулируются любым из гомологов белка S15. Например, трансляция мРНК_{Есо} не меняется в ответ на добавление GkaS15, а мутации в мРНК $_{Gka}$ и мРНК $_{Rra}$ не влияют на взаимодействие с белком S15 других организмов [94].

S15-связывающий участок мРНК E. coli, как и рРНК, имеет два пространственно разнесенных сайта связывания. Основной сайт мРНК_{Есо} схож с G·U/G-С-мотивом 16S рРНК, другой сайт лишь немного напоминает место пересечения трех спиралей. В T. thermophilus, напротив, основной сайт связывания схож с участком сочленения трех спиралей 16S pPHK, а G·U/G-С-мотив имеет замену – G·G/G-С (рис. 12г). Сайты связывания мРНК_{Gka} с белком S15 сходны с обоими связывающими участками на 16S pPHK (рис. 12д). Четвертая разновидность – мРНК_{Вга}, имеет консервативный участок G·U/G-C и структуру, напоминающую тройной узел (рис. 12в) [94]. Введение мутаций в G·U/G-C-мотив у E. coli и G. kaustophilus и в сайт, напоминающий структуру тройного узла у T. thermophilus и R. radiobacter, приводит к инактивации регуляторной функции белка S15 [95]. Аминокислотные остатки EcoS15, которые узнают малый желобок h22 16S pPHK, участвуют и в узнавании соответствующей спирали псевдоузла мРНК [96].

В отсутствие белка S15 *грsO* мРНК может принимать либо конформацию псевдоузла, либо двойной шпильки, но с рибосомой связывается только псевдоузел мРНК (рис. 13*a*). Ингибирование трансляции мРНК *грsO E. coli* осуществляется при переходе тройственного комплекса (S15 · 30S · мРНК) в неактивную конформацию [97]. Участок псевдоузла мРНК взаимодействует с N-концевым доменом белка S2 на рибосоме, а участок перед псевдоузлом контактирует с h26 16S pPHK. При этом SD



Рис. 12. Схемы S15-связывающих участков на PHK. $a - \Phi$ рагмент рPHK *E. coli*, сайт 1 (GGC) отмечен красным, сайт 2 (G·U/G-C-мотив) – синим. $\delta - \partial$ – Схемы S15-связывающих участков мPHK *E. coli* (δ), *R. radiobacter* (θ), *T. thermophilus* (z), *G. kaustophilus* (∂). Отмечены старт-кодон и последовательность SD. Синим цветом обведен G·U/G-C-мотив, красным – места пересечения трех спиралей, зеленым – дополнительные сайты связывания белка S15 на мPHK.

остается доступной для взаимодействия с рибосомой, так как находится внутри большой петли псевдоузла. Связываясь с рибосомой, S15 стабилизирует такое состояние мРНК, блокируя рибосому в преинициаторном состоянии и предотвращая переход инициаторного кодона в декодирующий центр (рис. 13*a*), что тормозит взаимодействие кодон—антикодон в P-сайте [98]. Это классический пример регуляции по принципу "ловушки".

Регуляторный сайт S15 мРНК в T. thermophilus образован тремя спирально-петельными участками (рис. 12г), которые не имеют структурного сходства с псевдоузлом мРНК в *E. coli* (рис. 126). При взаимодействии с белком TthS15 структура мРНК претерпевает конформационные изменения, в результате которых формируется структура мРНК, сходная с участком связывания белка на 16S рРНК. В результате участок связывания с 30S рибосомной субчастицей на мРНК становится недоступным (рис. 136) [95], и трансляция ингибируется [99]. Сродство EcoS15 к своей мРНК на два порядка ниже, чем сродство TthS15 к своей мРНК. Считается, что регуляция трансляции мРНК rpsO в T. thermophilus проходит по конкурентному механизму, а не по механизму "ловушки", как у Е. coli.

S4/α-оперон

 α -Оперон *E. coli* включает пять генов р-белков и ген α -субъединицы РНК-полимеразы (рис. 1*u*). Синтез белков оперона, кроме α -субъединицы РНК-полимеразы, регулирует белок S4 [100, 101]. S4 вместе с белком S7 инициирует сборку 30S рибосомной субчастицы [102, 103]. Он взаимодействует с 5'-концевым доменом 16S рРНК в месте пересечения пяти спиралей (h3, h4, h16–h18) [104–106]. Известно, что для образования функциональных комплексов белка S4 как с мРНК, так и с рРНК необходима лишь его N-концевая часть [107].

Структуры участков связывания белка S4 *E. coli* на мРНК и рРНК отличаются. Регуляторный участок на мРНК α -оперона представляет собой двойной псевдоузел (рис. 10*a*) [108], включающий 5'-НТО и начало кодирующего участка мРНК *rpsM* [109]. Спираль Н1 мРНК почти не имеет консервативных нуклеотидов, для регуляции наиболее важна ее пространственная укладка (рис. 10*a*). Старт-кодон мРНК *rpsM* (GUG) в 4 раза менее эффективен, чем AUG, однако замена GUG на AUG снижает экспрессию генов α -оперона *in vivo* в 6 раз [110]. Видимо, инициация трансляции мРНК α -оперона, как и ее репрессия, зависит от структуры этого участка мРНК.



Рис. 13. Иллюстрация механизма регуляции синтеза белка S15. *а* – Механизм "ловушки", по которому осуществляется ингибирование трансляции мРНК *rpsO* у *E. coli. б* – Модель конкурентного механизма регуляции трансляции р-белка S15 *T. thermophilus*. мРНК *rpsO* либо связывается с TthS15 и разрушается, либо связывается с 30S субчастицей, образуя активный инициаторный комплекс.

Механизм регуляции α-оперона по принципу "ловушки", как и в случае S15-оперона, основан на конформационном переключении между двумя структурами псевдоузла мРНК и формировании "неактивного" преинициаторного комплекса (рис. 14*б*) [91, 109, 111]. Преинициаторный комплекс формируется только с "активной" конформацией псевдоузла мРНК. "Неактивная" конформация мРНК образует комплекс с 30S субчастицей, но не может связывать тРНК^{fMet}. Белок S4 играет роль аллостерического репрессора, сдвигая равновесие между двумя конформациями мРНК в сторону "неактивной" формы [109, 112]. При регуляции трансляции по механизму "ловушки" нет необходимости в высокой аффинности репрессора к мРНК, сродство белка S4 *E. coli* к мРНК и рРНК примерно одинаково [113, 114].

У многих эубактерий ген белка S4 (rpsD) не входит в состав α -оперона. Так, ген rpsD *B. subtilis* представляет собой авторегулируемую транскрипционную единицу [115]. Вторичная структура S4-связывающего участка мРНК *B. subtilis* не имеет конформации псевдоузла [11], что свидетель-



Рис. 14. Регуляция α-оперона. *a* – Вторичная структура S4-связывающего псевдоузла мРНК *rpsM E. coli*. Последовательности SD и старт-кодона выделены зеленым. Красным выделены консервативные нуклеотиды. *б* – Схема репрессии трансляции α-оперона *E. coli* белком S4.

ствует о различиях в принципах узнавания белком S4 регуляторного участка у *B. subtilis* и у *E. coli*.

Необходимо отметить, что на ρ-зависимых терминаторах белок S4 выполняет такую же функцию, как и фактор транскрипции NusA при антитерминации транскрипции [116]. Таким образом, этот белок не только ингибирует трансляцию α-оперона, но и стимулирует транскрипцию pPHK, поддерживая сбалансированный синтез pPHK и p-белков.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ ПО МЕХАНИЗМУ РЕТРОРЕГУЛЯЦИИ

Механизм ретрорегуляции подразумевает деградацию мРНК рибонуклеазами в результате взаимодействия белка-репрессора с дистальным участком мРНК. В качестве хорошо изученного примера такой регуляции можно привести ингибирование синтеза белков L14—L24 S8/*spc*-оперона.

S8/spc-оперон

S8/spc-оперон *E. coli* состоит из 12 генов, экспрессия 10 из которых ингибируется при связывании р-белка S8 с межцистронным участком мРНК, включающим старт-кодон гена *rplE* (рис. 1к).

Консервативный двухдоменный белок S8 играет важную роль в сборке 30S субчастицы рибосомы, связываясь, в основном, со спиралью 21 16S pPHK [48]. Участки связывания белка S8 на мPHK и 16S pPHK *E. coli* очень похожи [117, 118] (рис. 15*a*, δ), но сродство к мPHK в 5 раз ниже, чем к специфическому фрагменту 16S pPHK [117].

Регуляторный участок расположен в 5'-концевой части мРНК белка L5 (рис. 15*в*) [119, 120]. В регуляторном комплексе с белком взаимодействует преимущественно внутренняя петля спирали мРНК [117]. Неспаренные А8 и А9 и пара G12–C79 мРНК (рис. 15*а*) консервативны [11]. Контакты белка S8 с внутренней петлей специ-



Рис. 15. Регуляция S8/*spc*-оперона. *а*, *б* – Вторичные структуры участков связывания белка S8 на мРНК (*a*) и рРНК (*б*) *Е. coli*. Рамкой выделен участок, с которым взаимодействует белок S8. SD и старт-кодон мРНК белка L5 выделены зеленым. Красным показаны консервативные нуклеотиды мРНК. *в* – Модель "ретрорегуляции" синтеза белков L14 и L24 белком S8 (показана часть S8/*spc*-оперона).

фического фрагмента мРНК аналогичны контактам с 16S рРНК [48, 117].

Связываясь с мРНК в начале гена белка L5, белок S8 напрямую блокирует его трансляцию. Нарушение трансляционного сопряжения приводит к ингибированию трансляции последующих цистронов белков (рис. 15в) [121]. Однако лишь у трех генов оперона отсутствуют SD, и некоторые из них располагаются с 3'-конца от места связывания S8 (рис. 15*в*). Предложен механизм регуляции экспрессии генов spc-оперона с участием эндонуклеаз и последующей деградацией мРНК экзонуклеазами. Согласно этой модели после действия эндонуклеазы (например, РНКазы III) происходит деградация мРНК L14-L24 3'-, 5'экзонуклеазами (полинуклеотидфосфорилазой и/или РНКазой II) (рис. 15в). Таким образом, ингибирование трансляции цистронов белков L14 и L24 происходит по механизму ретрорегуляции, что приводит к дестабилизации мРНК [122]. О регуляции трансляции самых удаленных цистронов *secY* и *rpmJ* (рис. 1κ) сведений нет.

S7/str-onepoн

S7/str-оперон E. coli состоит из четырех генов, кодирующих р-белки S12, S7 и факторы элонгации EF-G и EF-Tu (рис. 1л). Белок S7 ингибирует синтез р-белков S12 и S7 [123] и EF-G, причем, трансляция мРНК белков S7 и S12 сопряжена [124]. Белок S7 E. coli инициирует сборку 30S рибосомной субчастицы, организуя сворачивание 3'-концевого домена 16S рРНК и способствуя связыванию других р-белков, формирующих головку 30S субчастицы [103]. S7 взаимодействует с коротким двухпетлевым фрагментом 16S рРНК в нижней части 3'-концевого домена (рис. 166) [125].

Участок связывания белка на мРНК S7/strоперона *E. coli* находится между генами *rpsL* и *rpsG* [123] и содержит нерегулярную шпильку (рис. 16*a*). Минимальный фрагмент мРНК, который сохраняет сродство к S7, включает межцистронную область мРНК *str*. Вторичные структуры сайтов связывания белка на мРНК и рРНК различаются, при этом обе РНК содержат два идентичных S7-связывающих участка (рис. 16). Первый участок – спираль 42 16S рРНК и трех-



Рис. 16. Вторичные структуры S7-связывающих фрагментов мРНК (*a*) и рРНК (*б*). Идентичные последовательности, необходимые для связывания, выделены рамками. Стоп-кодон белка S12 (UAA) на фрагменте мРНК выделен серым, последовательность SD и инициаторный кодон S7 – зеленым.

спиральное сочленение мРНК *str* [124], второй – петли В и А рРНК и нижняя часть спирали III мРНК [126].

При взаимодействии с белком S7 спираль V мРНК дестабилизируется и репрессируется трансляция мРНК белков S7 и EF-G, трансляция цистрона S12 может ингибироваться по механизму ретрорегуляции [124, 127].

Структура участка мРНК S7/str-оперона не консервативна. S7/str-оперон T. thermophilus не содержит протяженного участка между генами rpsL и rpsG, а у Cyanobacteria эта последовательность больше похожа на специфический участок 16S pPHK [11].

Авторегуляция S20-оперона

Механизм авторегуляции S20-оперона к настоящему времени не установлен, и данные о конкретном участке связывания белка S20 на мРНК отсутствуют. Показано, что при дефиците аминокислот имеет место ppGpp-зависимая регуляция синтеза белка S20, причем для этой регуляции необходима лидерная последовательность мРНК [128].

Белок S20 — один из шести первично-связывающихся с 16S рРНК белков 30S субчастицы рибосомы. S20 взаимодействует с двумя участками 16S рРНК: спиралями 9, 11, 13 и спиралью 44, соединяя таким образом 5'-домен и 3'-минорный домен 16S рРНК [129]. Удаление белка S20 приводит к снижению скорости и эффективности связывания мРНК с рибосомой, а также к нарушениям сборки 30S субчастицы [130].

Синтез р-белка S20 авторегулируется на постранскрипционном уровне (рис. 1*м*) [131]. Предполагается, что S20 связывается с участком в 5'-НТО своей мРНК, блокируя SD и инициаторный кодон. Стоит отметить, что инициаторным кодоном гена *rpsT*, кодирующего р-белок S20, является последовательность UUG [132]. Минимальный участок, необходимый для эффективной регуляции синтеза S20, — инициаторный кодон UUG мРНК *rpsT* и окружающие его нуклеотиды. Замена UUG на AUG приводит к снижению ингибирующего эффекта белка S20 [133].

Несмотря на информацию о способности белка S20 ингибировать свой синтез как *in vivo*, так и *in vitro*, данных о его взаимодействии с фрагментами *rpsT* мРНК получить не удалось [133, 134]. Предполагается, что для регуляции синтеза белка S20 необходимо его взаимодействие не только с участком своей мРНК, а с преинициаторным комплексом мРНК-30S субчастица [133].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтез р-белков регулируется посредством двух довольно близких механизмов — конкуренции между участками связывания белка на рРНК и мРНК и механизму "ловушки". При конкурентном ингибировании трансляции участок связывания репрессора на мРНК может быть похож на участок связывания этого белка на рРНК (белок L1), а может и не иметь практически никакой гомологии (белок S2). Регуляция синтеза белков по механизму "ловушки" (S15-оперон и $S4/\alpha$ -оперон) осуществляется за счет блокировки рибосомы в преинициаторном состоянии при связывании белка-регулятора. Причем регуляторные участки связывания как белка S4. так и S15 на мРНК *E. coli* имеют структуру псевдоузла. Регуляторная область мРНК L20-оперона E. coli тоже имеет структуру псевдоузла, однако, регуляция синтеза белков этого оперона проходит не по механизму "ловушки", а по механизму конкуренции между репрессором и рибосомой за связывание с мРНК. Несмотря на то, что механизм регуляции по принципу "ловушки" более эффективен, чем механизм конкуренции, поскольку он может функционировать, даже если концентрация репрессора или его сродство к мРНК малы, регуляция трансляции большинства бактериальных мРНК подчиняется простому механизму конкуренции между репрессором и 30S субчастицей за взаимодействие с мРНК. При экспрессии генов рбелков может использоваться также механизм ретрорегуляции, подразумевающий дестабилизацию мРНК при взаимодействии с белком-репрессором (регуляция синтеза белков L14 и L24 белком S8 и, вероятно, синтеза белка S12 белком S7).

Несмотря на консервативность свойств рибосомных белков-регуляторов участки их связывания на мРНК и механизмы регуляции синтеза белков могут отличаться у разных организмов. Так, белок S15 *T. thermophilus* регулирует трансляцию S15-оперона по конкурентному типу, а не по механизму "ловушки", как у *E. coli*. У *B. subtilis* и некоторых других бактерий участки связывания р-белков L20, S15, S7 и S4 на мРНК отличаются от регуляторных участков этих белков у *E. coli*. Экспрессия генов L10-оперона *B. subtilis* может регулироваться не только посредством механизма конкуренции рибосомы с белковым комплексом за связывание с мРНК, как у *E. coli*, но и путем антитерминации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-14-50124.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований, выполненных с использованием биологических материалов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zengel J.M., Lindahl L. (1994) Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Esche*-

richia coli. Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. 47, 331–370.

- 2. Zengel J.M., Mueckl D., Lindahl L. (1980) Protein L4 of the *E. coli* ribosome regulates an eleven gene r protein operon. *Cell.* **21**(2), 523–535.
- 3. Schuwirth B.S., Borovinskaya M.A., Hau C.W., Zhang W., Vila-Sanjurjo A., Holton J.M., Cate J.H. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 A resolution. *Science*. **310**(5749), 827–834.
- Li X., Lindahl L., Zengel J.M. (1996) Ribosomal protein L4 from *Escherichia coli* utilizes nonidentical determinants for its structural and regulatory functions. *RNA*. 2(1), 24–37.
- Stelzl U., Zengel J.M., Tovbina M., Walker M., Nierhaus K.H., Lindahl L., Patel D.J. (2003) RNA-structural mimicry in *Escherichia coli* ribosomal protein L4-dependent regulation of the S10 operon. *J. Biol. Chem.* 278(30), 28237–28245.
- Stelzl U., Nierhaus K.H. (2001) A short fragment of 23S rRNA containing the binding sites for two ribosomal proteins, L24 and L4, is a key element for rRNA folding during early assembly. *RNA*. 7(4), 598–609.
- Freedman L.P., Zengel J.M., Archer R.H., Lindahl L. (1987) Autogenous control of the S10 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: genetic dissection of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(18), 6516–6520.
- Zengel J.M., Lindahl L. (1990) *Escherichia coli* ribosomal protein L4 stimulates transcription termination at a specific site in the leader of the S10 operon independent of L4-mediated inhibition of translation. *J. Mol. Biol.* 213(1), 67–78.
- 9. Zengel J.M., Lindahl L. (1996) A hairpin structure upstream of the terminator hairpin required for ribosomal protein L4-mediated attenuation control of the S10 operon of *Escherichia coli J. Bacteriol.* **178**(8), 2383– 2387.
- Sha Y., Lindahl L., Zengel J.M. (1995) RNA determinants required for L4-mediated attenuation control of the S10 r-protein operon of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 245(5), 486–498.
- Fu Y., Deiorio-Haggar K., Anthony J., Meyer M.M. (2013) Most RNAs regulating ribosomal protein biosynthesis in *Escherichia coli* are narrowly distributed to Gammaproteobacteria. *Nucl. Acids Res.* 41(6), 3491– 3503.
- Zengel J.M., Sha Y., Lindahl L. (2002) Surprising flexibility of leader RNA determinants for r-protein L4-mediated transcription termination in the *Escherichia coli* S10 operon. *RNA*. 8(5), 572–578.
- Zengel J.M., Lindahl L. (1990) Ribosomal protein L4 stimulates *in vitro* termination of transcription at a NusA-dependent terminator in the S10 operon leader. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(7), 2675–2679.
- Zengel J.M., Lindahl L. (1992) Ribosomal protein L4 and transcription factor NusA have separable roles in mediating terminating of transcription within the leader of the S10 operon of *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 6(12B), 2655–2662.
- 15. Sha Y., Lindahl L., Zengel J.M. (1995) Role of NusA in L4-mediated attenuation control of the S10 r-pro-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021
tein operon of *Escherichia coli. J. Mol. Biol.* 245(5), 474–485.

- Михайлина А.О., Костарева О.С., Сарских А.В., Федоров Р.В., Пиндл В., Гарбер М.Б., Тищенко С.В. (2014) Исследование регуляторных свойств архейного рибосомного белка L4. Биохимия. 79(1), 87–95.
- 17. Williams K.P. (2008) Strong mimicry of an rRNA binding site for two proteins by the mRNA encoding both proteins. *RNA Biol.* **5**(3), 145–148.
- Yates J.L., Arfsten A.E., Nomura M. (1980) *In vitro* expression of *Escherichia coli* ribosomal protein genes: autogenous inhibition of translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77(4), 1837–1841.
- Dean D., Nomura M. (1980) Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77(6), 3590–3594.
- 20. Brot N., Caldwell P., Weissbach H. (1981) Regulation of synthesis of *Escherichia coli* ribosomal proteins L1 and L11. *Arch. Biochem. Biophys.* **206**(1), 51–53.
- Kohrer C., Mayer C., Neumair O., Grobner P., Piendl W. (1998) Interaction of ribosomal L1 proteins from mesophilic and thermophilic archaea and bacteria with specific L1-binding sites on 23S rRNA and mR-NA. *Eur. J. Biochem.* 256(1), 97–105.
- Hanner M., Mayer C., Köhrer C., Golderer G., Gröbner P., Piendl W. (1994) Autogenous translational regulation of the ribosomal MvaL1 operon in the archaebacterium *Methanococcus vannielii*. J. Bacteriol. 176(2), 409–418.
- Yates J.L., Dean D., Strycharz W.A., Nomura M. (1981) *E. coli* ribosomal protein L10 inhibits translation of L10 and L7/L12 mRNAs by acting at a single site. *Nature*. 294(5837), 190–192.
- 24. Baughman G., Nomura M. (1983) Localization of the target site for translational regulation of the L11 operon and direct evidence for translational coupling in *Escherichia coli*. *Cell*. **34**(3), 979–988.
- 25. Mayer C., Kohrer C., Grobner P., Piendel W. (1998) MvaL1 autoregulates the synthesis of the three ribosomal proteins encoded on the MvaL1 operon of the archaeon *Methanococcus vannielii* by inhibiting its own translation before or at the formation of the first peptide bond. *Mol. Microbiol.* **27**(2), 455–468.
- Михайлина А.О., Костарева О.С., Никонова Е.Ю., Гарбер М.Б., Тищенко С.В. (2018) Идентификация сайтов связывания рибосомного белка L1 на мРНК *Thermus thermophilus* и *Thermotoga maritima*. *Молекуляр. биология*. **52**(1), 98–105.
- 27. Zimmermann R.A., Thurlow D.L., Finn R.S., Marsch T.L., Ferret L.K. (1980) Genetics and evolution of RNA polymerase, tRNA and ribosomes. *Univ. Tokyo Press, Tokyo.* **1**, 569–584.
- Gourse R.L., Thurlow D.L., Gerbi S.A., Zimmermenn R.A. (1981) Specific binding of a procaryot ribosomal protein to an eukaryotic ribosomal RNA: Implications for evolution and autoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(5), 2722–2726.
- Draper D.E. (1989) How do proteins recognize specific RNA sites? New clues from autogenously regulated ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 14(8), 335–338.

- Baier G., Hohenwarter O., Hofbauer C., Hummel H., Stoffler-Mailicke M., Stoffler G. (1989) Structural and functional equivalence between ribosomal proteins of *Escherichia coli* L1 and *Methanococcus vannielii* L6. *Syst. Appl. Microbiol.* 12, 119–126.
- Korepanov A.P., Kostareva O.S., Bazhenova M.V., Bubunenko M.G., Garber M.B., Tishchenko S.V. (2015) Studying the properties of domain I of the ribosomal protein L1: incorporation into ribosome and regulation of the L1 operon expression. *Protein J.* 34(2), 103–110.
- Nevskaya N., Tishchenko S., Volchkov S., Kljastorny V., Nikonova E., Nikonov O., Nikulin A., Kohrer C., Piendl W., Zimmermann R., Stockley, P., Garber, M., Nikonov S. (2006) New insights into the interaction of ribosomal protein L1 with RNA. *J. Mol. Biol.* 355(4), 747–759.
- 33. Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Nevskaya N., Sarskikh A., Kostareva O., Nikonova E., Sycheva A., Moshkovskii S., Garber M., Nikonov S. (2012) Highresolution crystal structure of the isolated ribosomal L1 stalk. *Acta Crystallogr. D.* 68(8), 1051–1057.
- 34. Gabdulkhakov A., Tishchenko S., Mikhaylina A., Garber M., Nevskaya N., Nikonov S. (2017) Crystal structure of the 23S rRNA fragment specific to r-protein L1 and designed model of the ribosomal L1 stalk from *Haloarcula marismortui*. Crystals. 7(2), 37.
- Boni I.V., Artamonova V.S., Tzareva N.V., Dreyfus M. (2001) Non-canonical mechanism for translational control in bacteria: synthesis of ribosomal protein S1. *EMBO J.* 20(15), 4222–4232.
- Boni I.V., Artamonova V.S., Dreyfus M. (2000) The last RNA binding repeat of the *Escherichia coli* ribosomal protein S1 is specifically involved in autogenous control. *J. Bacteriol.* 182(20), 5872–5879.
- Sengupta J., Agrawal R.K., Frank J. (2001) Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98(21), 11991–11996.
- Byrgazov K., Manoharadas S., Kaberdina A.C., Vesper O., Moll I. (2012) Direct interaction of the N-terminal domain of ribosomal protein S1 with protein S2 in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 7, e32702. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032702
- Sukhodolets M.V., Garges S., Adhya S. (2006) Ribosomal protein S1 promotes transcriptional cycling. *RNA*. 12(8), 1505–1513.
- Demo G., Rasouly A., Vasilyev N., Svetlov V., Loveland A.B., Diaz-Avalos R., Grigorieff N., Nudler E., Korostelev A.A. (2017) Structure of RNA polymerase bound to ribosomal 30S subunit. *eLife*. 6, e28560. https://doi.org/10.7554/eLife.28560
- Sorensen M.A., Fricke J., Pedersen S. (1998) Ribosomal protein S1 is required for translation of most, if not all, natural mRNAs in *Escherichia coli in vivo*. *J. Mol. Biol.* 280(4), 561–569.
- Duval M., Korepanov A., Fuchsbauer O., Fechter P., Haller A., Fabbretti A., Choulier L., Micura R., Klaholz B.P., Romby P. (2013) *Escherichia coli* ribosomal protein S1 unfolds structured mRNAs onto the ribosome for active translation initiation. *PLoS Biol.* 11(12), e1001731.

- 43. Lu Y., Lim L., Song J. (2017) NMR studies reveal that protein dynamics critically mediate aggregation of the well-folded and very soluble *E. coli* S1 ribosomal protein. *bioRXiv*. https://doi.org/10.1101/178459
 - https://doi.org/10.1101/1/8459
- 44. Hajnsdorf E., Boni I.V. (2012) Multiple activities of RNA-binding proteins S1 and Hfq. *Biochimie*. **94**(7), 1544–1553.
- 45. Dunn J.J., Buzash-Pollert E., Studier F.W. (1978) Mutations of bacteriophage T7 that affect initiation of synthesis of the gene 0.3 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **75**(6), 2741–2745.
- 46. Aseev L.V., Levandovskaya A.A., Tchufistova L.S., Skaptsova N.V., Boni I.V. (2008) A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2-mediated control of the *rpsB'tsf* expression *in vivo*. *RNA*. 14(9), 1882–1894.
- Yusupova G., Jenner L., Rees B., Moras D., Yusupov M. (2006) Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome. *Nature*. 444(7117), 391–394.
- 48. Brodersen D.E., Clemons Jr., W.M., Carter A.P., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. (2002) Crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: Structure of the proteins and their interactions with 16S RNA. J. Mol. Biol. 316(3), 725–768.
- 49. Асеев Л.В., Колединская Л.С., Бони И.В. (2014) Анализ активности и регуляции удлиненного "– 10" rpsB-промотора Escherichia coli in vivo. Биохимия. 79(8), 974–984.
- 50. An G., Bendiak D.S., Mamelak L.A., Friesen J.D. (1981) Organization and nucleotide sequence of a new ribosomal operon in *Escherichia coli* containing the genes for ribosomal protein S2 and elongation factor Ts. *Nucl. Acids Res.* 9(16), 4163–4172.
- 51. Bendiak D.S., Friesen J.D. (1981) Organization of genes in the four minute region of the *Escherichia coli* chromosome: evidence that *rpsB* and *tsf* are co-transcribed. *Mol. Gen. Genet.* **181**(3), 356–362.
- Merino E., Yanofsky C. (2005) Regulation by termination-antitermination: a genomic approach. *Trends Genet.* 21(5), 260–264.
- Lesage P., Chiaruttini C., Graffe M., Dondon J., Milet M., Springer M. (1992) Messenger RNA secondary structure and translational coupling in the *Escherichia coli* operon encoding translation initiation factor IF3 and the ribosomal proteins, L35 and L20. *J. Mol. Biol.* 228(2), 366–386.
- Spillmann S., Dohme F., Nierhaus K.H. (1977) Assembly *in vitro* of the 50S subunit from *Escherichia coli* ribosomes: proteins essential for the first heat dependent conformational change. *J. Mol. Biol.* 115(3), 513–523.
- Chiaruttini C., Milet M., Springer M. (1996) A longrange RNA-RNA interaction forms a pseudoknot required for translational control of the IF3-L35-L20 ribosomal protein operon in *Escherichia coli*. *EMBO J*. 15(16), 4402–4413.
- Allemand F., Haentjens J., Chiaruttini C., Royer C., Springer M. (2007) *Escherichia coli* ribosomal protein L20 binds as a single monomer to its own mRNA bearing two potential binding sites. *Nucl. Acids Res.* 35(9), 3016–3031.

- Harms J., Schluenzen F., Zarivach R., Bashan A., Gat S., Agmon I., Bartels H., Franceschi F., Yonath A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell.* 107(5), 679–688.
- Guillier M., Allemand F., Raibaud S., Dardel F., Springer M., Chiaruttini C. (2002) Translational feedback regulation of the gene for L35 in *Escherichia coli* requires binding of ribosomal protein L20 to two sites in its leader mRNA: a possible case of ribosomal RNA-messenger RNA molecular mimicry. *RNA*. 8(7), 878–889.
- Haentjens-Sitri J., Allemand F., Springer M., Chiaruttini C. (2008) A competition mechanism regulates the translation of the *Escherichia coli* operon encoding ribosomal proteins L35 and L20. *J. Mol. Biol.* 375(3), 612–625.
- Choonee N., Even S., Zig L., Putzer H. (2007) Ribosomal protein L20 controls expression of the *Bacillus subtilis infC* operon via a transcription attenuation mechanism. *Nucl. Acids Res.* 35(5), 1578–1588.
- Isono K., Kitakawa M. (1978) Cluster of ribosomal protein genes in *Escherichia coli* containing gene for proteins S6, S18, and L9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75(12), 6163–6167.
- Held W., Ballou B., Mizushima S., Nomura M. (1974) Assembly mapping of 30 S ribosomal proteins from *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* 249, 3103–3111.
- Agalarov S.C., Sridhar Prasad G., Funke P.M., Stout C.D., Williamson J.R. (2000) Structure of the S15, S6, S18-rRNA complex: assembly of the 30S ribosome central domain. *Science*. 288(5463), 107–113.
- 64. Recht M.I., Williamson J.R. (2001) Central domain assembly: thermodynamics and kinetics of S6 and S18 binding to an S15-RNA complex. *J. Mol. Biol.* **313**(1), 35–48.
- 65. Matelska D., Purta E., Panek S., Boniecki M.J., Bujnicki J.M., Dunin-Horkawicz S. (2013) S6:S18 ribosomal protein complex interacts with a structural motif present in its own mRNA. *RNA*. **19**(10), 1341–1348.
- 66. Fu Y., Deiorio-Haggar K., Soo M.W., Meyer M.M. (2014) Bacterial RNA motif in the 5' UTR of *rpsF* interacts with an S6:S18 complex. *RNA*. 20(2), 168–176.
- Babina A.M., Soo M.W., Fu Y., Meyer M.M. (2015) An S6:S18 complex inhibits translation of *E. coli rpsF. RNA*. 21(12), 2039–2046.
- 68. Dennis P.P., Fiil N.P. (1979) Transcriptional and post-transcriptional control of RNA polymerase and ribosomal protein genes cloned on composite ColE1 plasmids in the bacterium *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* **254**(16), 7540–7547.
- 69. Fukuda R. (1980) Autogenous regulation of the synthesis of ribosomal proteins, L10 and L7/12, in *Escherichia coli. Mol. Gen. Genet.* **178**(2), 483–486.
- Brot N., Caldwell P., Weissbach H. (1980) Autogenous control of *Escherichia coli* ribosomal protein L10 synthesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77(5), 2592–2595.
- 71. Holowachuk E.W., Friesen J.D., Fiil N.P. (1980) Bacteriophage lambda vehicle for the direct cloning of *Escherichia coli* promoter DNA sequences: feedback

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

regulation of the *rplJL-rpoBC* operon. *Proc. Natl.* Acad. Sci. USA. 77(4), 2124–2128.

- Friesen J.I., Tropak M., An C. (1983) Mutations in the *rplJ* leader of *Escherichia coli* that abolish feedback regulation. *Cell.* 32(2), 361–369.
- 73. Shimmin L.C., Dennis P.P. (1989) Characterization of the L11, L1, L10 and L12 equivalent ribosomal protein gene cluster of the halophilic archaebacterium *Halobacterium cutirubrum. EMBO J.* **8**(4), 1252–1235.
- Johnsen M., Christensen T., Dennis P.P., Fiil N.P. (1982) Autogenous control: ribosomal protein L10-L12 complex binds to the leader sequence of its mR-NA. *EMBO J.* 1(8), 999–1004.
- Diaconu M., Kothe U., Schlünzen F., Fischer N., Harms J.M., Tonevitsky, Stark H., Rodnina M.V., Wahl M.C. (2005) Structural basis for the function of the ribosomal L7/L12 stalk in factor binding and GT-Pase activation. *Cell.* **121**(7), 991–1004.
- Gordiyenko Y., Videler H., Zhou M., McKay A.R., Fucini P., Biegel E., Müller V., Robinson C.V. (2010) Mass spectrometry defines the stoichiometry of ribosomal stalk complexes across the phylogenetic tree. *Mol. Cell Prot.* 9(8), 1774–1783.
- 77. Ilag L.L., Videler H., McKay A.R., Sobott F., Fucini P., Nierhaus K.H., Robinson, C.V. (2005) Heptameric (L12)6/L10 rather than canonical pentameric complexes are found by tandem MS of intact ribosomes from thermophilic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **102**(23), 8192–8197.
- Klein D.J., Schmeing T.M., Moore P.B., Steitz T.A. (2001) The kink-turn: A new RNA secondary structure motif. *EMBO J.* 20(15), 4214–4221.
- Iben J.R., Draper D.E. (2008) Specific interactions of the L10(L12)4 ribosomal protein complex with mRNA, rRNA, and L11. *Biochemistry*. 47(9), 2721–2731.
- Climie S.C., Friesen J.D. (1987) Feedback regulation of the rplJL-rpoBC ribosomal protein operon of *Escherichia coli* requires a region of mRNA secondary structure. J. Mol. Biol. 198(3), 371–381.
- Babitzke P., Baker C.S., Romeo T. (2009) Regulation of translation initiation by RNA binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 27–44.
- Peattie D.A., Douthwaite S., Garrett R.A., Noller H.F. (1981) A "bulged" double helix in a RNA-protein contact site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 7(6), 1697–1701.
- Bouthwaite S., Christensen A., Garrett R.A. (1982) Binding site of ribosomal proteins on prokaryotic 5S ribonucleic acids: a study with ribonucleases. *Biochemistry*. 21(10), 2313–2320.
- Thurlow D.L., Ehresmann C., Ehresmann B. (1983) Nucleotides in 16S rRNA that are required in unmodified form for features recognized by ribosomal protein S8. *Nucl. Acids Res.* 11(19), 6787–6802.
- Gregory R.J., Zeller M.L., Thurlow D.L., Gourse R.L., Stark M. J.R., Dahlberg A.E., Zimmermann R.A. (1984) Interaction of ribosomal proteins S6, S8, S15 and S18 with the central domain of 16 S ribosomal RNA from *Escherichia coli. J. Mol. Biol.* **178**(2), 287– 302.
- 86. Stern S., Wilson R.C., Noller H.F. (1986) Localization of the binding site for protein S4 on 16S ribosomal

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

RNA by chemical and enzymatic probing and primer extension. J. Mol. Biol. **192**(1), 101–110.

- Climie S.C., Friesen J.D. (1988) *In vivo* and *in vitro* structural analysis of the *rplJ* mRNA leader of *Escherichia coli*. Protection by bound L10-L7/L12. *J. Biol. Chem.* 263(29), 15166–15175.
- Christensen T., Johnsen M., Fiil N.P., Friesen J.D. (1984) RNA secondary structure and translation inhibition: analysis of mutants in the *rplJ* leader. *EMBO J*. 3(7), 1609–1612.
- Yakhnin H., Yakhnin A.V., Babitzke P. (2015) Ribosomal protein L10(L12)4 autoregulates expression of the *Bacillus subtilis rplJL* operon by a transcription attenuation mechanism. *Nucl. Acids Res.* 43(14), 7032–7043.
- Merino E., Yanofsky C. (2002) Regulation by termination-antitermination: a genomic approach. *Bacillus* subtilis and its closest relatives: from genes to cells. Washington DC: ASM Press, 1, 323–336.
- Draper D.E., Gluick T.C., Schlax P.J. (1998) Pseudoknots, RNA folding, and translational regulation. In *RNA Structure and Function*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1, 415–436.
- Régnier P., Portier C. (1986) Initiation, attenuation and RNase III processing of transcripts from the *Escherichia coli* operon encoding ribosomal protein S15 and polynucleotide phosphorylase. *J. Mol. Biol.* 187(1), 23–32.
- Jarrige A.C., Mathy N., Portier C. (2001) PNPase autocontrols its expression by degrading a double-stranded structure in the pnp mRNA leader. *EMBO J.* 20(23), 6845–6855.
- 94. Slinger B.L., Newman H., Lee Y., Pei S., Meyer M.M. (2015) Co-evolution of bacterial ribosomal protein S15 with diverse mRNA regulatory structures. *PLoS Genet.* 11(12), e1005720.
- 95. Serganov A., Polonskaia A., Ehresmann B., Ehresmann C., Patel D.J. (2003) Ribosomal protein S15 represses its own translation via adaptation of an rRNA-like fold within its mRNA. *EMBO J.* 22(8), 1898–1908.
- 96. Mathy N., Pellegrini O., Serganov A., Patel D.J., Ehresmann C., Portier C. (2004) Specific recognition of rpsO mRNA and 16S rRNA by *Escherichia coli* ribosomal protein S15 relies on both mimicry and site differentiation. *Mol. Microbiol.* 52(3), 661–675.
- 97. Philippe C., Eyermann F., Bénard L., Portier C., Ehresmann B., Ehresmann C. (1993) Ribosomal protein S15 from *Escherichia coli* modulates its own translation by trapping the ribosome on the mRNA initiation loading site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**(10), 4394–4398.
- Marzi S., Myasnikov A.G., Serganov A., Ehresmann C., Romby P., Yusupov M., Klaholz B.P. (2007) Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome. *Cell.* 130(6), 1019–1031.
- Ehresmann C., Ehresmann B., Ennifar E., Dumas P., Garber M., Mathy N., Nikulin A., Portier C., Patel D., Serganov A. (2004) Molecular mimicry in translational regulation: the case of ribosomal protein S15. *RNA Biol.* 1(1), 66–73.

- 100. Jinks-Robertson S., Nomura M. (1982) Ribosomal protein S4 acts in trans as a translational repressor to regulate expression of the alpha operon in *Escherichia coli. Bacteriol.* **151**(1), 193–202.
- Thomas M., Bedwell D.M., Nomura M. (1987) Regulation of alpha operon gene expression in *Escherichia coli*. A novel form of translational coupling. *J. Mol. Biol.* 196(2), 333–345.
- 102. Nomura M., Held W.A. (1974) Reconstitution of ribosomes: Studies of ribosome structure, function and assembly. In *Ribosomes*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1, 193–224.
- 103. Nowotny V., Nierhaus K.H. (1988) Assembly of the 30S subunit from *Escherichia coli* ribosomes occurs via two assembly domains which are initiated by S4 and S7. *Biochemistry*. **27**(18), 7051–7055.
- 104. Schluenzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell.* **102**(5), 615–623.
- 105. Wimberly B.T., Brodersen D.E., Clemons Jr. W.M., Morgan-Warren R.J., Carter A.P., Vonrhein C., Hartsch T., Ramakrishnan V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. **407**(6802), 327–339.
- 106. Bellur D.L., Woodson S.A. (2009) A minimized rRNA binding site for ribosomal protein S4 and its implications for 30S assembly. *Nucl. Acids Res.* 37(6), 1886– 1896.
- 107. Baker A., Draper D. (1995) Messenger RNA recognition by fragments of ribosomal protein S4. J. Biol. Chem. 270(39), 22939–22945.
- Tang C.K., Draper D.E. (1989) Unusual mRNA pseudoknot structure is recognized by a protein translational repressor. *Cell.* 57(4), 531–536.
- Spedding G.S., Gluick T.C., Draper D.E. (1993) Ribosome initiation complex formation with the pseudoknotted alpha operon messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 229(3), 609–622.
- 110. Tang C.K., Draper D.E. (1990) Evidence for allosteric coupling between the ribosome and repressor binding sites of a translationally regulated mRNA. *Biochemistry*. **29**(18), 4434–4439.
- Schlax P.J., Xavier K.A., Gluick T.C., Draper D.E. (2001) Translational repression of the *Escherichia coli alpha* operon mRNA: importance of an mRNA conformational switch and a ternary entrapment complex. *J. Biol. Chem.* 276(42), 38494–38501.
- Spedding G.S., Draper D.E. (1993) Allosteric mechanism for translational repression in the *Escherichia coli* alpha operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**(10), 4399–4403.
- Deckman I.C., Draper D.E., Thomas M.S. (1987) S4alpha mRNA translation repression complex. I. Thermodynamics of formation. *J. Mol. Biol.* 196(2), 313– 322.
- 114. Vartikar J.V., Draper D.E. (1989) S4-16 S ribosomal RNA complex. Binding constant measurements and specific recognition of a 460-nucleotide region. *J. Mol. Biol.* 209(2), 221–234.
- 115. Grundy F.J., Henkin T.M. (1991) The *rpsD* gene, encoding ribosomal protein S4 is autogeneously regulat-

ed in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 173(15), 4595-4602.

- 116. Torres M., Condon C., Balada J.M., Squires C., Squires C.L. (2001) Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both nonribosomal and ribosomal RNA termination. *EMBO J.* 20(14), 3811– 3820.
- 117. Merianos H.J., Wang J., Moore P.B. (2004) The structure of a ribosomal protein *S8/spc*-operon mR-NA complex. *RNA*. **10**(6), 954–964.
- 118. Zimmermann R.A., Alimov A., Uma K., Wu H., Wower I., Nikonowicz E.P., Drygin D., Dong P., Jiang L. (2000) How proteins and RNA recognize one another. In *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*. Eds Garrett R.A., Dowthwaite S.A., Liljas A., Marbeson A.T., Moore P.B., Noller H. Washington DC.: ASM Press, 1, 93–104.
- Cerretti D.P., Mattheakis L.C., Kearney K.R., Vu L., Nomura M. (1988) Translational regulation of the *spc* operon in *Escherichia coli*: Identification and structural analysis of the target site for S8 repressor protein. *J. Mol. Biol.* 204(2), 309–329.
- 120. Gregory R.J., Cahill P.B., Thurlow D.L., Zimmermann R.A. (1988) Interaction of *Escherichia coli* ribosomal protein S8 with its binding sites in ribosomal RNA and messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 204(2), 295– 307.
- 121. Mattheakis L., Nomura M. (1988) Feedback regulation of the *spc* operon in *Escherichia coli*: Translational coupling and mRNA processing. *J. Bacteriol.* **170**(10), 4482–4492.
- 122. Mattheakis L., Vu L., Sor F., Nomura M. (1989) Retroregulation of the synthesis of ribosomal proteins L14 and L24 by feedback repressor S8 in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**(2), 448–452.
- 123. Dean D., Yates J.L., Nomura M. (1981) Identification of ribosomal protein S7 as a repressor of translation within the str operon of *E. coli. Cell.* **24**(2), 413–419.
- 124. Saito K., Mattheakis L.C., Nomura M. (1994) Posttranscriptional regulation of the str operon in *Escherichia coli*. Ribosomal protein S7 inhibits coupled translation of S7 but not its independent translation. *J. Mol. Biol.* 235(1), 111–124.
- Dragon F., Brakier-Gingras L. (1993) Interaction of Escherichia coli ribosomal protein S7 with 16S rRNA. Nucl. Acids Res. 21(5), 1199–1203.
- 126. Robert F., Brakier-Gingras L. (2001) Ribosomal protein S7 from *Escherichia coli* uses the same determinants to bind 16S ribosomal RNA and its messenger RNA. *Nucl. Acids Res.* **29**(3), 677–682.
- 127. Golovin A., Spiridonova V., Kopylov A. (2006) Mapping contacts of the S12–S7 intercistronic region of *str*-operon mRNA with ribosomal protein S7 of *E. coli*. *FEBS Lett.* 580(25), 5858–5862.
- Burgos H.L., O'Connor K., SanchezVazquez P., Gourse R.L. (2017) Roles of transcriptional and translational control mechanisms in regulation of ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli. J. Bacteriol.* 199, e00407–17.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

- 129. Hendrick E.G., Hill W.E. (2010) Protein S20 binds two
 16S rRNA sites as assembly is initiated. *J. Mol. Biol.*401, 493–502.
- Tobin C., Mandava C.S., Ehrenberg M., Andersson D.I., Sanyal S. (2010) Ribosomes lacking protein S20 are defective in mRNA binding and subunit association. *J. Mol. Biol.* **397**, 767–776.
- Parsons G.D., Mackie G.A. (1983) Expression of the gene for ribosomal protein S20: effects of gene dosage. *J. Bacteriol.* 154, 152–160.
- Mackie G.A. (1981) Nucleotide sequence of the gene for ribosomal protein S20 and its flanking regions. *J. Biol. Chem.* 256, 8177–8182.
- 133. Parsons G.D., Donly B.C., Mackie G.A. (1988) Mutations in the leader sequence and initiation codon of the gene for ribosomal protein S20 (*rpsT*) affect both translational efficiency and autoregulation. *J. Bacteriol.* **170**, 2485–2492.
- 134. Donly B.C., Mackie G.A. (1988) Affinities of ribosomal protein S20 and C-tenninal deletion mutants for 16S rRNA and S20 mRNA. *Nucl. Acids Res.* 16(3), 997–1010.

REGULATION OF RIBOSOMAL PROTEINS SYNTHESIS IN PROKARYOTES

A. O. Mikhaylina^{1, *}, E. Y. Nikonova¹, O. S. Kostareva¹, and S. V. Tishchenko¹

¹Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142290 Russia *e-mail: alisamikhaylina15@gmail.com

Protein biosynthesis is the primary activity of a living cell. Ribosome biogenesis requires proper regulation of ribosomal proteins genes expression, which is essential for the balanced synthesis of proteins and RNA. In this review, we discuss some features of the ribosomal protein synthesis autoregulation in prokaryotes. We discuss the mechanisms of inhibiting the synthesis of ribosomal proteins, namely, the competitive inhibition, the "trap" mechanism, and the retroregulation. The review describes examples of the regulation of protein synthesis by individual ribosomal proteins and their complexes.

Keywords: regulation of genes expression, operon, r-proteins, mRNA

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 575:616-053.2

ПРИЧИНЫ И ПОСЛЕДСТВИЯ ГЕНОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ПРИ ПСИХИЧЕСКИХ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© 2021 г. И. Ю. Юров^{*a*, *b*, *, С. Г. Ворсанова^{*a*, *b*}, О. С. Куринная^{*a*, *b*}, М. А. Зеленова^{*a*, *b*}, К. С. Васин^{*a*, *b*}, Ю. Б. Юров^{*a*, *b*}}

^аНаучный центр психического здоровья, Москва, 115522 Россия ^bНаучно-исследовательский клинический институт педиатрии им. акад. Ю.Е. Вельтищева Российского национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва, 125412 Россия *e-mail: ivan.iourov@gmail.com

Поступила в редакцию 29.06.2020 г. После доработки 11.07.2020 г. Принята к публикации 20.07.2020 г.

Известно, что каждый нейрон имеет 100-10000 связей (синапсов) с другими нервными клетками, а геномные аномалии, затрагивающие даже небольшое количество клеток головного мозга, могут приводить к функциональным изменениям центральной нервной системы (ЦНС). Так, при нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Альцгеймера и атаксия-телеангиэктазия) в клетках головного мозга наблюдается геномная и хромосомная нестабильность. При различных формах нарушения психики (шизофрения, аутистические расстройства, умственная отсталость, эпилепсия) наблюдается соматический мозаицизм, специфичный для ЦНС. Изучение генетических процессов в нервных клетках позволяет выделить определенное количество генных сетей и процессов-кандидатов, изменение которых приводит к нарушению стабильности генома. Соматические мутации возникают в головном мозге преимущественно на ранних этапах онтогенеза. Следовательно, наиболее вероятно, что вариабельность генома и соматический мозаицизм в различных областях головного мозга обусловлены нарушением таких процессов, как регуляция клеточного цикла, репарация/репликация ДНК и программируемая клеточная гибель. Помимо этого, при нейродегенеративных заболеваниях в клетках ЦНС происходят такие процессы, как эндомитоз/эндоредупликация и вхождение в клеточный цикл, аномальное для постмитотических нейронов. Принимая во внимание эти данные, предполагается, что нестабильность генома представляет собой один из ключевых элементов патогенетического каскада при болезнях мозга. В представленном обзоре рассмотрены соматические вариации генома в головном мозге при нейродегенеративных и психических заболеваниях, а также исследования, посвященные возможным причинам возникновения и последствиям геномной нестабильности в клетках ШНС.

Ключевые слова: геномная нестабильность, хромосомная нестабильность, головной мозг, генные сети, нейродегенерация, онтогенез, психические заболевания **DOI:** 10.31857/S0026898421010158

введение

За последние два десятилетия было неоднократно показано, что вариации генома могут быть причиной болезней центральной нервной системы (ЦНС). Подробно описан широкий спектр генных и хромосомных мутаций, а также вариаций числа копий последовательностей ДНК (сору number variations — CNV), способных приводить к развитию нейродегенеративных и психических заболеваний, представляющих значимую медицинскую и социальную проблему [1–5]. Особый интерес представляет анализ геномных вариаций непосредственно в клетках ЦНС, поскольку при соответствующих заболеваниях патологические процессы происходят именно в головном мозге. Примечательно, что геномная вариабельность может быть специфичной для популяции нервных клеток (тканеспецифический соматический мозаицизм) [6, 7]. В зависимости от количества аномальных клеток этот феномен может быть причиной как межклеточного функционального разнообразия (фоновый/минимальный уровень

Сокращения: PAC — расстройства аутистического спектра; ЦНС — центральная нервная система; CIN — хромосомная нестабильность (chromosome instability); CNV — вариации числа копий последовательностей ДНК (copy number variations); GIN — геномная нестабильность (genome instability); FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization); SNP — однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism).

соматических мутаций), так и нарушения гомеостаза клеток ЦНС при нервно-психических болезнях (увеличения уровня соматических мутаций) [8–11]. Если процесс накопления соматических мутаций носит прогрессирующий характер, то наблюдается геномная и/или хромосомная нестабильность (genome instability — GIN; chromosome instability — CIN), которая, как правило, является одним из ключевых элементов патогенетического каскада при ряде нейродегенеративных заболеваний [12, 13]. Таким образом, последствия GIN/CIN и соматического мозаицизма в клетках головного мозга могут различаться в зависимости от размера пораженной клеточной популяции.

Несмотря на то, что механизмы межклеточной вариабельности генома, включая мозаицизм и GIN/CIN, до конца не изучены, существует ряд убедительных моделей, описывающих молекулярные и клеточные процессы, приводящие к геномным вариациям в соматических клетках. В частности, известно, что соматические мутации аккумулируются, в основном, на самых ранних и поздних стадиях онтогенеза [14, 15]. Помимо этого, регулярные изменения генома (генные мутации и CNV), затрагивающие гены, которые участвуют в регуляции клеточного цикла, поддержании стабильности генома и запрограммированной клеточной гибели, могут быть причиной GIN или CIN [16–18]. Учитывая постмитотическую природу нейронов, особое внимание уделяется их аномальному вхождению в клеточный цикл, которое способно привести к хромосомному дисбалансу и клеточной гибели [19, 20]. Обосновано предположение о том, что нарушение стабильности генома клеток головного мозга обусловлено взаимодействием генетических и средовых факторов, инициирующим каскад аномальных внутриклеточных процессов, в результате которых формируется геномная (хромосомная) патология [21]. Механизм возникновения соматического мозаицизма и GIN/CIN, по-видимому, определяет возможное воздействие этих форм геномной вариабельности на функционирование головного мозга в норме и при нервных и психических заболеваниях.

В настоящей работе рассмотрена вариабельность генома в клетках головного мозга при нейродегенеративных и психических заболеваниях. Особое внимание уделено возможным причинам возникновения соматического мозаицизма и GIN/CIN в нейронах ЦНС. На основе анализа данных о геномных и хромосомных аномалиях в нервных клетках при болезнях мозга выделены генные сети и процессы-кандидаты, изменения которых могут приводить к GIN и CIN и, как следствие, к нарушению функционирования ЦНС.

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАЦИИ ГЕНОМА В КЛЕТКАХ ЦНС

Считается, что такие основные параметры ЦНС, как жизнеспособность клеточных популяций, предрасположенность к клеточной гибели и функциональные особенности, закладываются в ходе раннего онтогенеза (в основном, в первом и частично во втором триместре внутриутробного развития). В этот период также происходит беспрецедентное увеличение числа клеток эмбрионального мозга (со скоростью примерно 300000 клеток в минуту) [22, 23]. Изучение генетических особенностей этих клеточных популяций показало, что 30-35% клеток эмбрионального мозга являются анеуплоидными (увеличение или уменьшение количества хромосом в клетке, некратное гаплоидному набору (23 хромосомы) у человека). Фактически, в эмбриональном мозге человека наблюдается хромосомный мозаицизм, ограниченный тканями ЦНС, а также CIN, крайне похожая на CIN в раковых клетках [24, 25]. Примечательно, что помимо анеуплоидии клетки эмбрионального мозга также содержат множественные CNV, размер которых составляет менее 1 млн.п.н. [26, 27]. Таким образом, обоснован вывод о том, что в клеточных популяциях эмбрионального мозга человека наблюдается GIN на хромосомном (анеуплоидия) и субхромосомном/надмолекулярном (CNV) уровнях. Следует отметить, что уровни GIN/CIN максимальны именно в тот момент, когда максимальна скорость увеличения числа клеток в эмбриональном мозге. По-видимому, столь стремительный рост числа клеток вносит свой вклад в образование GIN и CIN [28]. На генном уровне (вариации нуклеотидной последовательности ДНК в виде генных мутаций и/или однонуклеотидных полиморфных замен, или SNP) подобные изменения отсутствуют, а число SNP и других форм изменений ДНК (мутаций) на генном уровне соответствует изменениям в половых клетках человека и других тканях [27-31]. На поздних стадиях внутриутробного развития общее число клеток в головном мозге плода снижается на 30-70% [32]. Молекулярно-генетические (молекулярно-цитогенетические) исследования головного мозга в постнатальном периоде свидетельствуют о том, что число анеуплоидных клеток, как и клеток с множественными CNV, снижается до 10% и меньше [10, 24, 26, 33]. Подобная корреляция уменьшения общего числа клеток и уровней GIN в ходе онтогенеза головного мозга объясняется тем. что хромосомные аномалии и CIN – это онтогенетический механизм регуляции размера клеточных популяций в ЦНС. Предполагается, что GIN/CIN представляют собой элемент каскада процессов запрограммированной клеточной гибели (например, посредством "митотической катастрофы"), которая считается одним из ключевых способов межклеточной селек-

ции для достижения функционального и структурного разнообразия нервных клеток у человека [7, 21, 27-29, 32]. Необходимо отметить, что подобные процессы наблюдаются в эмбриональном мозге и других позвоночных (мышей и рыб), но в постнатальном периоде число клеток, пораженных GIN/CIN, снижается в значительно меньшей степени [34-36]. Все это позволило предположить, что онтогенетические вариации генома в мозге плода — это специфичный для человека феномен, за счет которого достигается уникальная сложность и пластичность ЦНС [22, 27, 29]. Нарушение запрограммированной клеточной гибели может приводить к тому, что в постнатальном мозге будут присутствовать клетки с геномными и/или хромосомными аномалиями, которые образуются на ранних стадиях внутриутробного развития.

Аккумуляция соматических мутаций (хромосомные и генные мутации) рассматривается как один из наиболее важных генетических механизмов старения. Соматический мозаицизм, а также GIN/CIN наносят значительный ущерб клеточным популяциям, вызывая дегенерацию тканей, включая головной мозг [37-39]. Тем не менее, отсутствуют однозначные данные об увеличении уровней мозаицизма и GIN/CIN на поздних стадиях онтогенеза мозга человека. В ряде работ отмечено, что при старении возрастает уровень спорадической анеуплоидии в клетках ЦНС [37, 38, 40], в то время как в других публикациях сообщается об отсутствии существенного роста числа клеток с хромосомными/генными мутациями или CNV [41, 42]. По разным данным уровень соматического мозаицизма и GIN в клетках головного мозга составляет от 0.7 до 17% у индивидов старше 50 лет, а среди лиц моложе 50 лет — от 4.8 до 12%. Наименьший уровень определен в работах, выполненных с использованием секвенирования генома индивидуальных клеток, которое позволяет выявлять вариации генома с наивысшим разрешением, но обладает существенным ограничением по количеству исследуемых клеток (максимум 100 клеток). Наивысший уровень выявлен с помощью молекулярно-цитогенетических методов, основанных на флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), которые позволяют детектировать отдельные формы хромосомных и субхромосомных аномалий. С помощью этих методов можно изучать крупные клеточные популяции (1000 клеток и более) [28, 43-45]. Несмотря на отсутствие однозначных данных об увеличесоматического мозаишизма нии VDOBHЯ И GIN/CIN в клетках ЦНС в зависимости от возраста, аккумуляция соматических мутаций рассматривается в настоящее время в качестве одного из наиболее вероятных механизмов нарушений функционирования головного мозга в позднем онтогенезе [14, 38]. Подобное утверждение справедливо также для нейродегенеративных заболеваний [10, 46, 47] и психических болезней [21, 48, 49], проявляющихся, в основном, у пожилых индивидов. Таким образом, следует с высокой вероятностью утверждать, что повышение уровня соматических мутаций и GIN может быть механизмом, приводящим к дисфункции ЦНС.

ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

В настоящее время существует множество теорий относительно молекулярных причин нейродегенерации [50]. Среди них особое место занимают соматические мутации и GIN в клетках головного мозга [51, 52]. Более того, опубликовано много сообщений, согласно которым патологические процессы, наблюдаемые при нейродегенеративных заболеваниях, приводят к образованию GIN/CIN. В число этих процессов входят нарушение репарации ДНК [53, 54], аномальное вхождение нейронов в клеточный цикл [9, 20], репликативный стресс [55], нарушение процессов регуляции сегрегации хромосом в митозе [56, 57]. В частности, при болезни Альцгеймера (одной из самых распространенных болезней, ассоциированной с нейродегенерацией и поздней манифестацией) наблюдаются процессы, подобные малигнизации [58]. Эти процессы приводят к тому, что нейроны либо погибают, либо находятся в "состарившемся" состоянии (senescence-like state) [59, 60]. Примечательно, что при болезни Альцгеймера более чем в 2 раза увеличивается число клеток головного мозга с анеуплоидией (моносомией или потерей) хромосомы Х, цитогенетическим маркером процесса старения организма [61]. Необходимо отметить, что на протяжении нескольких последних десятилетий обсуждается возможность ассоциации анеуплоидии хромосомы 21 (трисомия, или наличие дополнительной хромосомы) с болезнью Альцгеймера, поскольку при синдроме Дауна (трисомия хромосомы 21) наблюдается деменция по "альцгеймеровскому типу" после 35 лет. Помимо этого, на хромосоме 21 в участке 21q21.3 расположен ген APP, кодирующий трансмембранный белок, предшественник бета-амилоида – компонента амилоидных бляшек при болезни Альцгеймера (маркер заболевания) [47]. Мутации в этом гене ассоциированы с нарушением сегрегации хромосом и хромосомным мозаицизмом (CIN), включая трисомию хромосомы 21 [62]. Изучение вариаций последовательностей гена АРР в клетках ШНС при болезни Альшгеймера показало, что среди механизмов этого заболевания могут быть CNV с участием этого гена (увеличение числа копий) и повышенный уровень его соматической рекомбинации [63]. Изучение хромосомного набора в постмортальных образцах головного мозга индивидов с болезнью Альцгеймера выявило в 6-15% нервных клеток CIN, пре-

имущественно вовлекающую в нестабильность хромосому 21, в виде анеуплоидии (моносомии и трисомии) [10, 64]. Анализ последствий анеуплоидии в клетках ЦНС при данном заболевании показал, что она приводит к клеточной гибели [13]. Гены, мутации которых связаны с редкими семейными формами болезни Альцгеймера (пресенилины 1 и 2 /PS1 и PS2/ и MAPT), участвуют в процессах регуляции сегрегации хромосом в митозе и ассоциированы с образованием CIN [47]. Описаны также случаи заболевания, при которых в клетках головного мозга обнаружен соматический мозаицизм по мутациям генов PS1, PS2, МАРТ и АРР [65]. Таким образом, можно утверждать, что нейродегенеративные процессы при болезни Альцгеймера обусловлены CIN (вовлекает преимущественно хромосому 21), которая, по-видимому, возникает за счет нарушения таких генных сетей (pathways), как регуляция клеточного цикла, сегрегация хромосом в митозе, репарация ДНК и запрограммированная клеточная гибель.

CIN в виде анеуплоидии и разрывов интерфазных хромосом, ограниченная клетками мозжечка, ассоциирована с механизмом нейродегенерации при атаксии-телеангиэктазии — болезни, вызываемой мутациями в гене АТМ, кодирующем белок, необходимый для поддержания стабильности генома [12]. Мутации гена МАРТ, вызывающие лобно-височную (фронто-темпоральную) дегенерацию, приводят к CIN в виде анеуплоидии (трисомии) хромосом 12 и 21 в клетках ЦНС индивидов с этим заболеванием [66]. При деменции с тельцами Леви наблюдается повышенный уровень анеуплоидии, которая, вероятно, приводит к характерной гистопатологической картине [67]. Аккумуляция трисомных клеток в ЦНС также выявляется и при болезни Нимана-Пика (тип С1), связанной с мутациями в гене NPC1 [56]. Исследования вариабельности генома в клетках головного мозга при болезни Паркинсона выявили локальную нестабильность в виде CNV (увеличение числа копий) гена SNCA в дофаминергических нейронах; мутации этого гена считаются одной из причин семейных случаев этого заболевания [68]. Как можно заметить, между нейродегенеративными процессами и малигнизацией клеток имеется много параллелей [21, 54, 57, 58, 64]. Возникает вопрос относительного различия между GIN/CIN при онкологических заболеваниях и при нейродегенерации [69]. Детальное исследование этой проблемы позволило предложить модель, объясняющую это различие. Так, клеточные популяции, вызывающие онкологические заболевания, характеризуются GIN/CIN, которые возникают за счет соматических мутаций в отдельных клетках и клональной эволюции, тогда как при нейродегенерации GIN и CIN (как правило, специфического типа) накапливаются в ходе онтогенеза и после определенного взаимодействия с

окружающей средой в клетках с GIN/CIN инициируются процессы запрограммированной гибели [70]. Суммируя результаты изучения причин и последствий геномной патологии при нейродегенеративных заболеваниях, можно сделать следующие выводы: 1) GIN/CIN (преимущественно в виде анеуплоидии) — это элемент каскада нейродегенеративных процессов; 2) патология ЦНС при нейродегенеративных заболеваниях обуславливается нарушением таких процессов, как регуляция клеточного цикла, репарация и репликация ДНК, запрограммированная клеточная гибель; 3) очень вероятно, что изменение генных сетей, обеспечивающих отсутствие "сбоев" в осуществлении этих процессов, может быть причиной нейродегенерации.

ГЕНОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ПРИ ПСИХИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В последние годы идея о том, что нервные и психические заболевания могут быть вызваны геномными вариациями непосредственно в клетках головного мозга, стала общепринятой [71, 72]. Первая работа в области изучения геномной (хромосомной) патологии при психических болезнях посвящена анализу клеток ЦНС при шизофрении (самом распространенном психическом заболевании). В результате обнаружили, что отдельные случаи шизофрении могут быть связаны с анеуплоидией хромосом 18 и Х [73]. Дальнейшие молекулярно-цитогенетические исследования хромосомного мозаицизма в постмортальных образцах головного мозга больных шизофренией (n = 22) позволили обнаружить CIN в виде анеуплоидии хромосомы 1 [74] и половых хромосом [75]. Ассоциация этих вариаций генома клеток головного мозга с шизофренией установлена с помощью непараметрических статистических методов (в частности, U-критерий Манна-Уитни). Изучение GIN с помощью секвенирования выявило SNP, специфичные для популяций клеток ЦНС пациентов с шизофренией [76]. Описаны также случаи шизофрении, при которых в клетках головного мозга находили неспецифические CNV [77] и делеции в участках 2q31.2 (ген *PRKRA*), 5q35.2 (ген *BOD1*) и 7p15.2 (ген *CBX3*) [78], не выявленные в контрольных образцах. GIN и CIN также неоднократно обнаруживали в различных типах клеток (клетки крови и биопсии кожи) больных шизофренией [79]. Эти данные позволили сделать обоснованный вывод о том. что GIN/CIN представляет собой один из механизмов этого тяжелого и распространенного заболевания [80]. Важно отметить, что подходы к поиску причин соматической анеуплоидии в различных клеточных популяциях (например, в раковых клетках), основанные на принципах системной биологии, позволили выделить ряд процессов-кандидатов [81], также изменяемых при психических заболеваниях [21, 48, 71].

Среди психических заболеваний, обладающих ярко выраженной генетической компонентой, выделяют аутистические расстройства, или расстройства аутистического спектра (РАС) [82, 83]. При данной форме нарушения психики систематически выявляют соматический мозаицизм в виде мозаичной анеуплоидии, структурных хромосомных аномалий, CNV и генных мутаций [84, 85]. Изучение постмортальных клеток головного мозга индивидов с РАС выявило специфические соматические мутации в генах SCN1A, SCN2A, SETD2, ARID1B [86]. К сожалению, до настоящего времени не опубликованы результаты анализа GIN/CIN в клетках ЦНС при РАС. При других формах нарушения развития ЦНС (умственная отсталость и эпилепсия) в клетках головного мозга неолнократно нахолили соматические мутании в различных генах, среди которых особое место занимают гены АКТІ, АКТЗ, МТОР, РІКЗСА, TSC1 и TSC2, поскольку кодируемые ими белки участвуют во множестве процессов, необходимых для обеспечения стабильности генома [87-89]. Спектр мутаций не ограничивается перечисленными генами, хотя необходимо отметить, что в нескольких работах описаны нарушения именно этих генов [72, 87, 89]. GIN/CIN ассоциированы с поведенческими нарушениями (в частности, посттравматический синдром, болезнь "войны в заливе"), а ухудшение состояния пациентов коррелирует, как правило, с ростом уровня GIN или CIN [90, 91].

Изучение генов-кандидатов показало, что с шизофренией может быть ассоциирован крупный кластер генов, вовлеченных в сеть клеточного цикла [92, 93]. Нарушения клеточного цикла обнаруживали ранее в экспериментальных моделях этого заболевания [94]. Подобные изменения также найдены и при РАС [95, 96], при которых наблюдаются также нарушения запрограммированной клеточной гибели (апоптоза) [97]. Анализ публикаций по соматическому мозаицизму и GIN/CIN в клетках ЦНС при психических заболеваниях указывает на острую необходимость более активного изучения этих феноменов при РАС, умственной отсталости и эпилепсии. При шизофрении подобных исследований значительно больше, однако в наших знаниях о геномной вариабельности в клетках головного мозга при этом заболевании имеется целый ряд пробелов. Тем не менее, показано, что определенное число случаев психических болезней связано с соматическим мозаицизмом и GIN/CIN в различных областях головного мозга, возможно, обусловленным нарушением процессов регуляции клеточного цикла и запрограммированной клеточной гибели.

ГЕННЫЕ СЕТИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С НАРУШЕНИЕМ СТАБИЛЬНОСТИ ГЕНОМА, В КЛЕТКАХ ЦНС

С помощью методологии системной биологии изучено большое количество данных, полученных в рамках анализа геномных ассоциаций и генетических нарушений (генные мутации, CNV и хромосомные аномалии) при болезнях мозга. Основным результатом этих исследований стало выделение процессов-кандидатов или генных сетей ("молекулярных путей"). Среди них в контексте геномных вариаций и нестабильности в клетках ЦНС можно выделить регуляцию клеточного цикла, включая контроль сегрегации хромосом в митозе и репликацию ДНК, апоптоз, репарацию ДНК, "клеточное старение" (сенесценцию), сигнальный путь МАРК (митоген-активируемые протеинкиназы) [72, 98–101]. Показано, что GIN/CIN и соматический мозаицизм могут быть связаны с мутациями и CNV в генах, кодирующих элементы указанных сетей [16, 39, 102-104]. Имеются сообщения об общих "молекулярных путях" при онкологических и нервно-психических заболеваниях. известных как "Pathwavs in cancer" [105, 106]. Специфические генные сети, изменение которых ассоциировано с патологией головного мозга при психических заболеваниях и поддержанием стабильности генома, представлены mTOR [88, 100], PI3K-Akt, p53 [72, 89] и PTEN [107]. Как отмечалось ранее, при ряде болезней мозга нарушения этих генных сетей и процессов подтверждены экспериментально. Более того, указанные генные сети рассматривают как мишени для лекарственной терапии [108–113].

Поскольку соматический мозаицизм и GIN/ CIN считаются генетической причиной различных заболеваний (в зависимости от пораженной ткани) [114–116], существует возможность экстраполировать на нервные клетки данные, полученные на других клеточных популяциях. Так, межклеточная геномная вариабельность преимущественно возникает в период внутриутробного развития, а нарушения процессов, инициирующих клеточную гибель, приводят к высокому уровню соматического мозаицизма или GIN/CIN после рождения [14-18, 39]. В митотических клетках соматические хромосомные мутации часто возникают при нарушении сегрегации хромосом в ходе деления клетки и аномальной регуляции клеточного цикла [18, 39]. Однако следует иметь в виду, что клетки ЦНС человека по большой части постмитотические. Это, вероятно, приводит к тому, что нарушения регуляции клеточного цикла, связанные с патологией головного мозга, носят специфический характер и в основном представлены аномальным вхождением в клеточный цикл, эндоредупликацией/эндомитозом и репликативным стрессом [20, 44, 46, 55, 99].



Рис. 1. Схематическое изображение механизма нейродегенеративных и психических болезней, связанного с соматическим мозаицизмом и GIN/CIN (подробное описание в тексте). Использованы части иллюстраций, показывающие результаты анализа анеуплоидии методом FISH, взятые из работ Yurov и соавт. 2007, 2011 и 2014 [25, 61] (Creative Commons Attribution License 2.0).

Не исключено, что нейрогенез (образование "новых" нейронов) на поздних стадиях онтогенеза (процесс, который регрессирует на протяжении жизни организма) также может быть причиной возникновения нервных клеток с геномной и/или хромосомной патологией за счет отсутствия канонических форм репарации и нарушения сегрегации хромосом в митозе [7, 22, 99]. Соматические мутации, представляющие связующее звено между генетическими и средовыми компонентами патогенеза болезней мозга, могут быть вызваны отрицательным влиянием окружающей среды [21, 117, 118]. Таким образом, обосновано предположение о том, что нарушение функционирования головного мозга при нейродегенеративных и психических заболеваниях обусловлено сложными взаимодействиями клеточного генома и окружающей среды, а мозаицизм и GIN/CIN можно рассматривать как ключевой элемент каскада патологических процессов, вызванных такими взаимодействиями.

Основываясь на современных представлениях о возможных причинах GIN/CIN и соматического мозаицизма, можно предложить схему патогенеза болезней мозга, связанного с данными феноменами (рис. 1). Высокие уровни GIN/CIN в эмбриональном мозге снижаются за счет запрограммированной клеточной гибели. Нарушение этого процесса, а также отрицательные эффекты окружающей среды, которые, скорее всего, изменяют генные сети mTOR, PI3K-Akt, p53, PTEN и МАРК, могут привести к отклонениям в регуляции клеточного цикла (нерасхождению хромосом в митозе, репликативному стрессу) и репарации ДНК. В результате в клетках головного мозга образуется соматический мозаицизм и/или прогрессирует GIN/CIN. Эти процессы, в свою очередь, нарушают гомеостаз нервных клеток, что критически изменяет функционирование ЦНС как на уровне отдельных клеток, так и определенных областей головного мозга. В зависимости от характера изменений на уровне отдельных нервных клеток, вызванных генетическими причинами, возможна потеря критической клеточной массы (нейродегенерация) или нарушение функциональной активности областей мозга за счет синаптической активности нейронов с аномальным геномом. Следует отметить, что кроме вышеуказанных процессов-кандидатов нарушения функционирования головного мозга при нейродегенеративных и психических заболеваниях, рассматриваются и другие генные сети [4, 50, 119].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обзор современных данных о причинах и последствиях вариаций генома в клетках головного мозга при нейродегенеративных и психических заболеваниях показывает, что соматический мозаицизм и GIN/CIN можно рассматривать как механизмы дисфункции ЦНС при болезнях мозга. С определенной долей уверенности можно утверждать, что нарушения генных сетей ("молекулярных путей") и изменения процессов, необходимых для обеспечения сохранности стабильности генома, регуляции клеточного цикла и запрограммированной клеточной гибели, приводят к соответствующим формам GIN или CIN, которые входят в состав патогенетического каскада при нейродегенерации и других формах дисфункции ЦНС. С высокой вероятностью можно считать, что эти процессы инициируются неблагоприятным влиянием окружающей среды.

Крайне важно отметить, что соматический мозаицизм, GIN или CIN не следует рассматривать как основные (исключительные) механизмы патологии головного мозга. Абсолютизация как описанных патологических процессов, так и других механизмов нарушения функционирования ЦНС может привести к неприемлемо упрощенной картине этиологии болезней мозга, что неминуемо станет преградой на пути к разработке научно обоснованных методов молекулярной диагностики и терапии социально значимых нейродегенеративных и психических заболеваний. Объединение данных, полученных благодаря исследованиям в различных областях молекулярной и клеточной биологии мозга, позволит на основе принципов системной биологии определить обобщенный механизм (general pathway) нарушения функционирования ЦНС за счет соматического мозаицизма и GIN/CIN, что необходимо для успешного лечения болезней мозга [4, 21, 82, 120–123]. Знания, полученные в ходе подобного анализа, будут, несомненно, иметь исключительное значение для таких фундаментальных дисциплин, как геномика человека, нейробиология и молекулярная медицина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-115-50415 ("Экспансия").

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований, выполненных с использованием биологических материалов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. McGuffin P., Owen M.J., Gottesman I.I. (2002) *Psychiatric Genetics and Genomics*. Oxford, UK, Oxford University Press.
- Lee J.A., Lupski J.R. (2006) Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron.* 52, 103–121.
- 3. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. (2008) Molecular cytogenetics and cytogenomics of brain diseases. *Curr. Genomics.* 9, 452–465.
- Parikshak N.N., Gandal M.J., Geschwind D.H. (2015) Systems biology and gene networks in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Genet.* 16, 441–458.
- Smoller J.W., Andreassen O.A., Edenberg H.J., Faraone S.V., Glatt S.J., Kendler K.S. (2019) Psychiatric genetics and the structure of psychopathology. *Mol. Psychiatry*. 24, 409–420.
- Kingsbury M.A., Yung Y.C., Peterson S.E., Westra J.W., Chun J. (2006). Aneuploidy in the normal and diseased brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2626–2641.
- Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. (2006) Chromosomal variation in mammalian neuronal cells: known facts and attractive hypotheses. *Int. Rev. Cytol.* 249, 143–191.
- Kingsbury M.A., Friedman B., McConnell M.J., Rehen S.K., Yang A.H., Kaushal D., Chun J. (2005) Aneuploid neurons are functionally active and integrated into brain circuitry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 6143–6147.
- 9. Mosch B., Morawski M., Mittag A., Lenz D., Tarnok A., Arendt T. (2007) Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **27**, 6859–6867.
- 10. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T., Yurov Y.B. (2009) Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning. *Neurobiol. Dis.* **34**, 212– 220.

- Knouse K.A., Wu J., Whittaker C.A., Amon A. (2014) Single cell sequencing reveals low levels of aneuploidy across mammalian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111, 13409–13414.
- Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T., Kolotii A.D., Yurov Y.B. (2009) Increased chromosome instability dramatically disrupts neural genome integrity and mediates cerebellar degeneration in the ataxia-telangiectasia brain. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2656–2669.
- 13. Arendt T., Brückner M.K., Mosch B., Lösche A. (2010). Selective cell death of hyperploid neurons in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **177**, 15–20.
- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Iourov I.Y. (2010) Ontogenetic variation of the human genome. *Curr. Genomics.* 11, 420–425.
- Zhang L., Vijg J. (2018) Somatic mutagenesis in mammals and its implications for human disease and aging. *Annu. Rev. Genet.* 52, 397–419.
- Kennedy S.R., Loeb L.A., Herr A.J. (2012) Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration. *Mech. Ageing Dev.* 133, 118–126.
- 17. Varetti G., Pellman D., Gordon D.J. (2014) Aurea mediocritas: the importance of a balanced genome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a015842.
- Mitrentsi I., Yilmaz D., Soutoglou E. (2020) How to maintain the genome in nuclear space. *Curr. Opin. Cell Biol.* 64, 58–66.
- 19. Herrup K., Yang Y. (2007) Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 368–378.
- Arendt T. (2012) Cell cycle activation and aneuploid neurons in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 46, 125–135.
- Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. (2013) Somatic cell genomics of brain disorders: a new opportunity to clarify genetic-environmental interactions. *Cytogenet. Genome Res.* 139, 181–188.
- Muotri A.R., Gage F.H. (2006) Generation of neuronal variability and complexity. *Nature*. 441, 1087– 1093.
- 23. Herculano-Houzel S. (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front. Hum. Neurosci.* **3**, 31.
- Yurov Y.B., Iourov I.Y., Monakhov V.V., Soloviev I.V., Vostrikov V.M., Vorsanova S.G. (2005) The variation of aneuploidy frequency in the developing and adult human brain revealed by an interphase FISH study. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 385–390.
- 25. Yurov Y.B., Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Liehr T., Kolotii A.D., Kutsev S.I., Pellestor F., Beresheva A.K., Demidova I.A., Kravets V.S., Monakhov V.V., Soloviev I.V. (2007) Aneuploidy and confined chromosomal mosaicism in the developing human brain. *PLoS One.* 2, e558.
- Rohrback S., April C., Kaper F., Rivera R.R., Liu C.S., Siddoway B., Chun J. (2018) Submegabase copy number variations arise during cerebral cortical neurogenesis as revealed by single-cell whole-genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 115, 10804–10809.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

- Rohrback S., Siddoway B., Liu C.S., Chun J. (2018) Genomic mosaicism in the developing and adult brain. *Dev. Neurobiol.* 78, 1026–1048.
- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Iourov I.Y. (2018) Human molecular neurocytogenetics. *Curr. Genet. Med. Rep.* 6, 155–164.
- 29. Bushman D.M., Chun J. (2013) The genomically mosaic brain: an uploidy and more in neural diversity and disease. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **24**, 357–369.
- Gawad C., Koh W., Quake S.R. (2016) Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat. Rev. Genet.* 17, 175–188.
- 31. Muyas F., Zapata L., Guigó R., Ossowski S. (2020) The rate and spectrum of mosaic mutations during embryogenesis revealed by RNA sequencing of 49 tissues. *Genome Med.* **12**, 49.
- Fricker M., Tolkovsky A.M., Borutaite V., Coleman M., Brown G.C. (2018) Neuronal cell death. *Physiol. Rev.* 98, 813–880.
- McConnell M.J., Lindberg M.R., Brennand K.J., Piper J.C., Voet T., Cowing-Zitron C., Shumilina S., Lasken R.S., Vermeesch J.R., Hall I.M., Gage F.H. (2013) Mosaic copy number variation in human neurons. *Science*. 342, 632–637.
- 34. Kaushal D., Contos J.J., Treuner K., Yang A.H., Kingsbury M.A., Rehen S.K., McConnell M.J., Okabe M., Barlow C., Chun J. (2003) Alteration of gene expression by chromosome loss in the postnatal mouse brain. J. Neurosci. 23, 5599–5606.
- Yang A.H., Kaushal D., Rehen S.K., Kriedt K., Kingsbury M.A., McConnell M.J., Chun J. (2003) Chromosome segregation defects contribute to aneuploidy in normal neural progenitor cells. *J. Neurosci.* 23, 10454–10462.
- 36. Zupanc G.K. (2009) Towards brain repair: Insights from teleost fish. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **20**, 683–690.
- Andriani G.A., Vijg J., Montagna C. (2017) Mechanisms and consequences of aneuploidy and chromosome instability in the aging brain. *Mech. Ageing Dev.* 161, 19–36.
- Vijg J., Dong X., Milholland B., Zhang L. (2017) Genome instability: a conserved mechanism of ageing? *Essays Biochem.* 61, 305–315.
- Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Kutsev S.I. (2019) Ontogenetic and pathogenetic views on somatic chromosomal mosaicism. Genes (Basel). 10, E379.
- Fischer H.G., Morawski M., Brückner M.K., Mittag A., Tarnok, A., Arendt T. (2012) Changes in neuronal DNA content variation in the human brain during aging. *Aging Cell.* 11, 628–633.
- 41. Van den Bos H., Spierings D.C., Taudt A.S., Bakker B., Porubský D., Falconer E., Novoa C., Halsema N., Kazemier H.G., Hoekstra-Wakker K., Guryev V., den Dunnen W.F., Foijer F., Tatché M.C., Boddeke H.W., Lansdorp P.M. (2016) Single-cell whole genome sequencing reveals no evidence for common aneuploidy in normal and Alzheimer's disease neurons. *Genome Biol.* 17, 116.
- 42. Chronister W.D., Burbulis I.E., Wierman M.B., Wolpert M.J., Haakenson M.F., Smith A.C.B., Kleinman J.E., Hyde T.M., Weinberger D.R., Bekiranov S., McConnell M.J. (2019) Neurons with complex karyo-

types are rare in aged human neocortex. *Cell Rep.* **26**, 825–835.e7.

- Iourov I.Y., Liehr T., Vorsanova S.G., Kolotii A.D., Yurov Y.B. (2006) Visualization of interphase chromosomes in postmitotic cells of the human brain by multicolour banding (MCB). *Chromosome Res.* 14, 223–229.
- Faggioli F., Vijg J., Montagna C. (2011) Chromosomal aneuploidy in the aging brain. *Mech. Ageing Dev.* 132, 429–436.
- 45. Andriani G.A., Maggi E., Piqué D., Zimmerman S.E., Lee M., Quispe-Tintaya W., Maslov A., Campisi J., Vijg J., Mar J.C., Montagna C. (2019) A direct comparison of interphase FISH versus low-coverage single cell sequencing to detect aneuploidy reveals respective strengths and weaknesses. *Sci. Rep.* 9, 10508.
- 46. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. (2012) Single cell genomics of the brain: focus on neuronal diversity and neuropsychiatric diseases. *Curr. Genomics.* **13**, 477–488.
- 47. Potter H., Chial H.J., Caneus J., Elos M., Elder N., Borysov S., Granic A. (2019) Chromosome instability and mosaic aneuploidy in neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *Front. Genet.* **10**, 1092.
- 48. Тиганов А.С., Юров Ю.Б., Ворсанова С.Г., Юров И.Ю. (2012) Нестабильность генома головного мозга: этиология, патогенез и новые биологические маркеры психических болезней. Вест. РАМН. 9, 45–53.
- Graham E.J., Vermeulen M., Vardarajan B., Bennett D., De Jager P., Pearse R.V. 2nd, Young-Pearse T.L., Mostafavi S. (2019) Somatic mosaicism of sex chromosomes in the blood and brain. *Brain Res.* 1721, 146345.
- Pluvinage J.V., Wyss-Coray T. (2020) Systemic factors as mediators of brain homeostasis, ageing and neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 93–102.
- Leija-Salazar M., Piette C., Proukakis C. (2018) Somatic mutations in neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 44, 267–285.
- 52. Shepherd C.E., Yang Y., Halliday G.M. (2018) Region- and cell-specific aneuploidy in brain aging and neurodegeneration. *Neuroscience*. **374**, 326–334.
- 53. Coppedè F., Migliore L. (2015) DNA damage in neurodegenerative diseases. *Mutat. Res.* **776**, 84–97.
- Lin X., Kapoor A., Gu Y., Chow M.J., Peng J., Zhao K., Tang D. (2020) Contributions of DNA damage to Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1666.
- 55. Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Iourov I.Y. (2011) The DNA replication stress hypothesis of Alzheimer's disease. *Sci. World J.* **11**, 2602–2612.
- 56. Granic A., Potter H. (2013) Mitotic spindle defects and chromosome mis-segregation induced by LDL/cholesterol-implications for Niemann-Pick C1, Alzheimer's disease, and atherosclerosis. *PLoS One.* **8**, e60718.
- Bajic V., Spremo-Potparevic B., Zivkovic L., Isenovic E.R., Arendt T. (2015) Cohesion and the aneuploid phenotype in Alzheimer's disease: A tale of genome instability. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 55, 365– 374.

- Nudelman K.N.H., McDonald B.C., Lahiri D.K., Saykin A.J. (2019) Biological hallmarks of cancer in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 56, 7173–7187.
- Fielder E., von Zglinicki T., Jurk D. (2017) The DNA damage response in neurons: die by apoptosis or survive in a senescence-like state? *J. Alzheimers Dis.* 60, S107–S131.
- 60. Baker D.J., Petersen R.C. (2018) Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J. Clin. Invest.* **128**, 1208–1216.
- 61. Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Liehr T., Kolotii A.D., Iourov I.Y. (2014) X chromosome aneuploidy in the Alzheimer's disease brain. *Mol. Cytogenet.* **7**, 20.
- 62. Granic A., Padmanabhan J., Norden M., Potter H. (2010) Alzheimer Abeta peptide induces chromosome mis-segregation and aneuploidy, including trisomy 21: requirement for tau and APP. *Mol. Biol. Cell.* 21, 511– 520.
- 63. Lee M.H., Siddoway B., Kaeser G.E., Segota I., Rivera R., Romanow W.J., Liu C.S., Park C., Kennedy G., Long T., Chun J. (2018) Somatic APP gene recombination in Alzheimer's disease and normal neurons. *Nature*. 563, 639–645.
- 64. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. (2011) Genomic landscape of the Alzheimer's disease brain: chromosome instability aneuploidy, but not tetraploidy mediates neurodegeneration. *Neurodegener. Dis.* **8**, 35–37.
- 65. Sala Frigerio C., Lau P., Troakes C., Deramecourt V., Gele P., Van Loo P., Voet T., De Strooper B. (2015) On the identification of low allele frequency mosaic mutations in the brains of Alzheimer's disease patients. *Alzheimer's Dement.* 11, 1265–1276.
- 66. Caneus J., Granic A., Rademakers R., Dickson D.W., Coughlan C.M., Chial H.J., Potter H. (2018) Mitotic defects lead to neuronal aneuploidy and apoptosis in frontotemporal lobar degeneration caused by *MAPT* mutations. *Mol. Biol. Cell.* 29, 575–586.
- Yang Y., Shepherd C., Halliday G. (2015) Aneuploidy in Lewy body diseases. *Neurobiol. Aging.* 36, 1253– 1260.
- Mokretar K., Pease D., Taanman J.W., Soenmez A., Ejaz A., Lashley T., Ling H., Gentleman S., Houlden H., Holton J.L., Schapira A.H.V., Nacheva E., Proukakis C. (2018) Somatic copy number gains of α-synuclein (*SNCA*) in Parkinson's disease and multiple system atrophy brains. *Brain*. 141, 2419–2431.
- Hou Y., Song H., Croteau D.L., Akbari M., Bohr V.A. (2017) Genome instability in Alzheimer disease. *Mech. Ageing Dev.* 161, 83–94.
- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Iourov I.Y. (2019) Chromosome instability in the neurodegenerating brain. *Front. Genet.* 10, 892.
- 71. McConnell M.J., Moran J.V., Abyzov A., Akbarian S., Bae T., Cortes-Ciriano I., Erwin J.A., Fasching L., Flasch D.A., Freed D., Ganz J., Jaffe A.E., Kwan K.Y., Kwon M., Lodato M.A., Mills R.E., Paquola A.C.M., Rodin R.E., Rosenbluh C., Sestan N., Sherman M.A., Shin J.H., Song S., Straub R.E., Thorpe J., Weinberger D.R., Urban A.E., Zhou B., Gage F.H., Lehner T., Senthil G., Walsh C.A., Chess A., Courchesne E., Gleeson J.G., Kidd J.M., Park P.J., Pevsner J., Vacca-

rino F.M., Brain Somatic Mosaicism Network (2017) Intersection of diverse neuronal genomes and neuropsychiatric disease: the brain somatic mosaicism network. *Science*. **356**, eaal1641.

- D'Gama A.M., Walsh C.A. (2018) Somatic mosaicism and neurodevelopmental disease. *Nat. Neurosci.* 21, 1504–1514.
- 73. Yurov Y.B., Vostrikov V.M., Vorsanova S.G., Monakhov V.V., Iourov I.Y. (2001) Multicolor fluorescent *in situ* hybridization on post-mortem brain in schizophrenia as an approach for identification of low-level chromosomal aneuploidy in neuropsychiatric diseases. *Brain Dev.* 23, S186–S190.
- Yurov Y.B., Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Demidova I.A., Kravetz V.S., Beresheva A.K., Kolotii A.D., Monakchov V.V., Uranova N.A., Vostrikov V.M., Soloviev I.V., Liehr T. (2008) The schizophrenia brain exhibits lowlevel aneuploidy involving chromosome 1. *Schizophr. Res.* 98, 139–147.
- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Demidova I.A., Kolotii A.D., Soloviev I.V., Iourov I.Y. (2018) Mosaic brain aneuploidy in mental illnesses: an association of low-level post-zygotic aneuploidy with schizophrenia and comorbid psychiatric disorders. *Curr. Genomics.* 19, 163–172.
- Fullard J.F., Charney A.W., Voloudakis G., Uzilov A.V., Haroutunian V., Roussos P. (2019) Assessment of somatic single-nucleotide variation in brain tissue of cases with schizophrenia. *Transl. Psychiatry.* 9, 21.
- Kim J., Shin J.Y., Kim J.I., Seo J.S., Webster M.J., Lee D., Kim S. (2014) Somatic deletions implicated in functional diversity of brain cells of individuals with schizophrenia and unaffected controls. *Sci. Rep.* 4, 3807.
- 78. Sakai M., Watanabe Y., Someya T., Araki K., Shibuya M., Niizato K., Oshima K., Kunii Y., Yabe H., Matsumoto J., Wada A., Hino M., Hashimoto T., Hishimoto A., Kitamura N., Iritani S., Shirakawa O., Maeda K., Miyashita A., Niwa S.I., Takahashi H., Kakita A., Kuwano R., Nawa H. (2015) Assessment of copy number variations in the brain genome of schizophrenia patients. *Mol. Cytogenet.* 8, 46.
- 79. Smith C.L., Bolton A., Nguyen G. (2010) Genomic and epigenomic instability, fragile sites, schizophrenia and autism. *Curr Genomics*. **11**, 447-469.
- 80. Юров Ю.Б., Ворсанова С.Г., Демидова И.А., Кравец В.С., Востриков В.М., Соловьев И.В., Уранова Н.А., Юров И.Ю. (2016) Геномная нестабильность в клетках головного мозга: хромосомный мозаицизм при шизофрении. *Журн. Неврологии и Психиатрии им. С.С. Корсакова.* **116**, 86–91.
- Ye C.J., Regan S., Liu G., Alemara S., Heng H.H. (2018) Understanding aneuploidy in cancer through the lens of system inheritance, fuzzy inheritance and emergence of new genome systems. *Mol. Cytogenet.* 11, 31.
- Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Сильванович А.П., Демидова И.А., Юров И.Ю. (2013) Современные представления о молекулярной генетике и геномике аутизма. Фунд. Исслед. 4, 356–367.
- 83. Castellani C.A., Arking D.E. (2020) High-risk, high-reward genetics in ASD. *Neuron*. **105**, 407–410.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Iourov I.Y., Demidova I.A., Beresheva A.K., Kravetz V.S., Monakhov V.V., Kolotii A.D., Voinova-Ulas V.Y., Gorbachevskaya N.L. (2007) Unexplained autism is frequently associated with low-level mosaic aneuploidy. *J. Med. Genet.* 44, 521–525.
- 85. Biesecker L.G., Spinner N.B. (2013) A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 307–320.
- D'Gama A.M., Pochareddyk S., Li M., Jamuar S.S., Reiff R.E., Lam A.N., Sestan N., Walsh C.A. (2015) Targeted DNA sequencing from autism spectrum disorder brains implicates multiple genetic mechanisms. *Neuron.* 88, 910–917.
- 87. Koh H.Y., Lee J.H. (2018) Brain somatic mutations in epileptic disorders. *Mol. Cells.* **41**, 881–888.
- Park S.M., Lim J.S., Ramakrishina S., Kim S.H., Kim W.K., Lee J., Kang H.C., Reiter J.F., Kim D.S., Kim H.H., Lee J.H. (2018) Brain somatic mutations in *MTOR* disrupt neuronal ciliogenesis, leading to focal cortical dyslamination. *Neuron.* 99, 83–97.e7.
- Ye Z., McQuillan L., Poduri A., Green T.E., Matsumoto N., Mefford H.C., Scheffer I.E., Berkovic S.F., Hildebrand M.S. (2019) Somatic mutation: the hidden genetics of brain malformations and focal epilepsies. *Epilepsy Res.* 155, 106161.
- Liu G., Ye C.J., Chowdhury S.K., Abdallah B.Y., Horne S.D., Nichols D., Heng H.H. (2018) Detecting chromosome condensation defects in gulf war illness patients. *Curr. Genomics.* 19, 200–206.
- Vorsanova S.G., Zelenova M.A., Yurov Y.B., Iourov I.Y. (2018) Behavioral variability and somatic mosaicism: a cytogenomic hypothesis. *Curr. Genomics.* 19, 158– 162.
- 92. Okazaki S., Boku S., Otsuka I., Mouri K., Aoyama S., Shiroiwa K., Sora I., Fujita A., Shirai Y., Shirakawa O., Kokai M., Hishimoto A. (2016) The cell cycle-related genes as biomarkers for schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **70**, 85–91.
- 93. Yang J., Yan B., Fan Y., Yang L., Zhao B., Zhu F., Zheng J., Wang W., Bai L., Zhang F., Ma X. (2019) Identification of schizophrenia related biological pathways across eight brain regions. *Behav. Brain Res.* 360, 1–6.
- Fan Y., Abrahamsen G., McGrath J.J., Mackay-Sim A. (2012) Altered cell cycle dynamics in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. **71**, 129–135.
- 95. Pramparo T., Lombardo M.V., Campbell K., Barnes C.C., Marinero S., Solso S., Young J., Mayo M., Dale A., Ahrens-Barbeau C., Murray S.S., Lopez L., Lewis N., Pierce K., Courchesne E. (2015) Cell cycle networks link gene expression dysregulation, mutation, and brain maldevelopment in autistic toddlers. *Mol. Syst. Biol.* 11, 841.
- Gumusoglu S.B., Hing B.W.Q., Chilukuri A.S.S., Dewitt J.J., Scroggins S.M., Stevens H.E. (2020) Chronic maternal interleukin-17 and autism-related cortical gene expression, neurobiology, and behavior. *Neuropsychopharmacology*. 45, 1008–1017.
- 97. Wei H., Alberts I., Li X. (2014) The apoptotic perspective of autism. *Int. J. Dev. Neurosci.* **36**, 13–18.

- Pan L., Penney J., Tsai L.H. (2014) Chromatin regulation of DNA damage repair and genome integrity in the central nervous system. *J. Mol. Biol.* 426, 3376–3388.
- 99. Paquola A.C.M., Erwin J.A., Gage F.H. (2017) Insights into the role of somatic mosaicism in the brain. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **1**, 90–94.
- 100. LiCausi F., Hartman N.W. (2018) Role of mTOR complexes in neurogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1544.
- Ziats C.A., Rennert O.M., Ziats M.N. (2019) Toward a pathway-driven clinical-molecular framework for classifying autism spectrum disorders. *Pediatr. Neurol.* 98, 46–52.
- 102. Putnam C.D., Allen-Soltero S.R., Martinez S.L., Chan J.E., Hayes T.K., Kolodner R.D. (2012) Bioinformatic identification of genes suppressing genome instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, E3251– E3259.
- 103. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Zelenova M.A., Korostelev S.A., Yurov Y.B. (2015) Genomic copy number variation affecting genes involved in the cell cycle pathway: implications for somatic mosaicism. *Int. J. Genomics.* 2015, 757680.
- 104. Sugaya K. (2019) Chromosome instability caused by mutations in the genes involved in transcription and splicing. *RNA Biol.* 16, 1521–1525.
- 105. Crawley J.N., Heyer W.D., LaSalle J.M. (2016) Autism and cancer share risk genes, pathways, and drug targets. *Trends Genet.* **32**, 139–146.
- 106. Markkanen E., Meyer U., Dianov G.L. (2016) DNA damage and repair in schizophrenia and autism: implications for cancer comorbidity and beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 856.
- 107. Ho J., Cruise E.S., Dowling R.J.O., Stambolic V. (2020) PTEN nuclear functions. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* **10**, a036079.
- Erickson R.P. (2010) Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat. Res.* **705**, 96–106.
- 109. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. (2010) Somatic genome variations in health and disease. *Curr. Genomics.* **11**, 387–396.
- Campbell I.M., Shaw C.A., Stankiewicz P., Lupski J.R. (2015) Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends Genet.* 31, 382–392.

- 111. Wang L., Zhou K., Fu Z., Yu D., Huang H., Zang X., Mo X. (2017) Brain development and Akt signaling: the crossroads of signaling pathway and neurodevelopmental diseases. *J. Mol. Neurosci.* 61, 379–384.
- 112. Thadathil N., Hori R., Xiao J., Khan M.M. (2019) DNA double-strand breaks: a potential therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Chromosome Res.* 27, 345–364.
- 113. Hussain R., Zubair H., Pursell S., Shahab M. (2018) Neurodegenerative diseases: regenerative mechanisms and novel therapeutic approaches. *Brain Sci.* **8**, 177.
- 114. Howell K.R., Law A.J. (2020) Neurodevelopmental concepts of schizophrenia in the genome-wide association era: AKT/mTOR signaling as a pathological mediator of genetic and environmental programming during development. *Schizophr. Res.* **217**, 95–104.
- Martínez-Cué C., Rueda N. (2020) Cellular senescence in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 16.
- 116. Wilhelm T., Said M., Naim V. (2020) DNA replication stress and chromosomal instability: dangerous liaisons. *Genes (Basel)*. **11**, E642.
- 117. Дюжикова Н.А., Даев Е.В. (2018) Геном и стрессреакция у животных и человека. Экологическая генетика. 16, 4–26.
- 118. Horne S.D., Chowdhury S.K., Heng H.H. (2014) Stress, genomic adaptation, and the evolutionary trade-off. *Front. Genet.* **5**, 92.
- 119. Резник А.М., Костюк Г.П., Ханнанова А.Н. (2016) Проблемы предпосылок шизофрении по данным молекулярно-генетических исследований. *Социальная и клиническая психиатрия*. 26, 101–108.
- 120. Пузырев В.П. (2014) Медицинская патогенетика. Вавиловский Журн. Генет. Селекции. 18, 7–21.
- 121. Iourov I.Y., Vorsanova S.G., Yurov Y.B. (2019) The variome concept: focus on CNVariome. *Mol. Cytogenet.* **12**, 52.
- 122. Vorsanova S.G., Yurov Y.B., Iourov I.Y. (2020) Dynamic nature of somatic chromosomal mosaicism, genetic-environmental interactions and therapeutic opportunities in disease and aging. *Mol. Cytogenet.* 13, 16.
- Guerreiro R., Gibbons E., Tábuas-Pereira M., Kun-Rodrigues C., Santo G.C., Bras J. (2020) Genetic architecture of common non-Alzheimer's disease dementias. *Neurobiol. Dis.* 142, 104946.

CAUSES AND CONSEQUENCES OF GENOME INSTABILITY IN PSYCHIATRIC AND NEURODEGENERATIVE DIEASES

I. Y. Iourov^{1, 2, *}, S. G. Vorsanova^{1, 2}, O. S. Kurinnaia^{1, 2}, M. A. Zelenova^{1, 2}, K. S. Vasin^{1, 2}, and Y. B. Yurov^{1, 2}

¹Mental Health Research Center, Moscow, 115522 Russia

²Veltishchev Research Clinical Institute of Pediatrics, Pirogov Russian National University, Moscow, 125412 Russia

*e-mail: ivan.iourov@gmail.com

Since each neuron possesses 100–10000 connections (synapses) with other neural cells, genome pathologies affecting a small proportion of brain cell are capable of causing a dysfunction of entire central nervous system (CNS). Recently, genome and chromosome instability has been uncovered in the neurodegenerating brain

ПРИЧИНЫ И ПОСЛЕДСТВИЯ ГЕНОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ

53

(Alzheimer's disease, ataxia telangiectasia). In the brain of individuals with neuropsychiatric diseases, including schizophrenia, autism, intellectual disability and epilepsy, somatic tissue-specific mosaicism was observed. Brain-specific somatic mutations generally occur at the earliest stages of the development. Accordingly, genome variability and somatic mosaicism are expected to contribute to cell cycle regulation, DNA reparation/replication, and programmed cell death in the brain. Endomitosis/endoreduplication and abortive entrance to the cell cycle are also commonly observed in the neurodegenerating brain. Brain-specific genome instability may be a key element in the pathogenic cascade of neurodegeneration. Here we review current state of knowledge concerning somatic genome variations in neurodegenerative and psychiatric diseases and analyze the causes and consequences of genomic instability in the CNS.

Keywords: genomic instability, chromosomal instability, brain, pathways, neurodegeneration, ontogeny, psychiatric diseases

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 57.042

ОТДЕЛЫ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ МЫШИ ОТЛИЧАЮТСЯ ПО КОЛИЧЕСТВУ ТРАНСКРИПТОВ ПРОТЕАСОМНЫХ ГЕНОВ

© 2021 г. С. Ю. Фуников^{*a*}, Д. С. Спасская^{*a*}, А. В. Буров^{*a*, *b*}, Е. В. Тетерина^{*c*}, А. А. Устюгов^{*c*}, В. Л. Карпов^{*a*}, А. В. Морозов^{*a*}, *

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия ^bМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия ^cИнститут физиологически активных вешеств Российской академии наук.

нститут физиологически иктивных веществ 1 оссийской икиоемий н Московская область, Черноголовка, 142432 Россия

> *e-mail: Runkel@inbox.ru Поступила в редакцию 18.06.2020 г. После доработки 29.06.2020 г. Принята к публикации 30.06.2020 г.

Протеасома – мультисубъединичный белковый комплекс, осуществляющий деградацию большинства внутриклеточных белков. Из 14 субъединиц 20S протеасом три (β1, β2 и β5) обладают каталитической активностью и осуществляют гидролиз пептидной связи после кислых, основных и гидрофобных аминокислот соответственно. В составе протеасом конститутивные каталитические субъединицы β1, β2 и β5 могут быть заменены так называемыми иммунными субъединицами β1i, β2і и β5і. Однако не всегда в составе протеасом присутствуют сразу все иммунные субъединицы; известны протеасомы, содержащие как иммунные, так и конститутивные субъединицы. Встраивание иммунных субъединиц меняет профиль пептидов, производимых протеасомами, что имеет большое значение в процессах презентации антигенов и клеточном ответе на стресс и. по-вилимому, в целом ряде внутриклеточных сигнальных путей. Нами разработана система для количественного определения абсолютных уровней экспрессии генов конститутивных и иммунных субъединиц протеасом мыши, основанная на ПЦР в реальном времени. С помощью полученной системы оценены уровни экспрессии генов субъединиц протеасом в тканях центральной нервной системы (ЦНС) мыши. Выявлено, что количество транскриптов каталитических субъединии протеасом в разных отделах ЦНС существенно отличается. Приведенные результаты позволяют подразделить исследованные отделы мозга на две категории: условно с "высокими" (кора головного мозга и спинной мозг) и "низкими" (гиппокамп и мозжечок) уровнями экспрессии генов субъединиц протеасом. Кроме того, можно выделить отделы с близкими и существенно различающимися профилями экспрессии генов каталитических субъединиц протеасом. Так, профили экспрессии генов в коре, спинном мозге и мозжечке похожи друг на друга, однако отличаются от профиля экспрессии в гиппокампе. На основании полученных данных можно сделать заключение о вероятных различиях в пуле протеасом, а также в функциональной нагрузке на убиквитин-протеасомную систему в разных отделах ШНС.

Ключевые слова: убиквитин-протеасомная система, протеасома, иммунопротеасома **DOI:** 10.31857/S002689842006004X

введение

20S протеасома представляет собой центральный элемент убиквитин-протеасомной системы (УПС), обеспечивающий деградацию большинства внутриклеточных белков. Протеасома состоит из 28 белков, организованных в четыре гептамерных кольца, уложенных друг на друга. Четырнадцать из этих белков относятся к альфа-, а другие 14 — к бета-субъединицам; при этом каждая субъединица присутствует в составе протеасомы в двух копиях [1]. Таким образом, в составе 20S протеасомы присутствует 7 различных альфаи 7 различных бета-субъединиц. Альфа-субъединицы кодируются генами *PSMA1-7*, а бета-субъединицы – группой генов *PSMB1-7*. Три из семи бета-субъединиц обладают каталитической активностью и, находясь в составе протеасом, гидролизуют пептидные связи после кислых (β1, кодируется геном *PSMB6*), основных (β2, кодируется геном *PSMB7*) и гидрофобных аминокислотных остатков (β5, кодируется геном *PSMB5*) [2]. Осуществляя де-

Сокращения: УПС – убиквитин-протеасомная система; ЦНС – центральная нервная система.

градацию внутриклеточных белков, УПС участвует в регуляции практически всех фундаментальных клеточных процессов, включая контроль клеточного цикла, регуляцию транскрипции и трансляции, ответ на биотические и абиотические стрессовые факторы [3]. Кроме того, УПС играет важную роль в патофизиологии опухолевого роста, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний [3-5]. УПС обладает пластичностью, что выражается в наличии различных форм протеасом, а также в тонкой регуляции активности протеасом для решения специфических задач, стоящих перед клеткой. Так, протеасомы могут взаимодействовать с белкамикофакторами, а субъединицы протеасом могут подвергаться посттрансляционным модификациям, влияющим на активность и субстратную специфичность комплекса [6]. Еше один важный механизм адаптации протеасом для выполнения специфических задач связан с заменой конститутивных каталитических субъединиц β1, β2 и β5 так называемыми иммунными субъединицами β1i, β2i и β5i (кодируются генами *PSMB9*, *PSMB10* и PSMB8 соответственно). Это повышает эффективность деградации окисленных и поврежденных белков [7], а также отражается на наборе пептидов, производимых протеасомами. Иммунные протеасомы обладают повышенной химотрипсинподобной активностью и поэтому более эффективно производят пептиды с гидрофобными аминокислотами на С-конце, что необходимо для их эффективного связывания с молекулами главного комплекса гистосовместимости первого класса (MHC-I) и, как следствие, презентации антигенов [8]. По-видимому, это одна из причин большого количества таких протеасом в клетках иммунной системы. Этим же можно объяснить и стимуляцию синтеза иммунных субъединиц в соматических клетках при развитии воспалительных процессов. Однако, как оказалось, в клетках различных органов, таких как печень, почки, различные отделы кишечника, в норме присутствует большое количество промежуточных протеасом, содержащих как иммунные, так и конститутивные каталитические субъединицы [9]. Роль таких протеасом до конца не ясна, однако, учитывая, что при встраивании иммунных субъединиц происходят изменения в наборе производимых протеасомами пептидов, а также вероятную биологическую активность последних, можно предположить, что они выполняют регуляторные тканеспецифические функции [10]. Таким образом, экспрессия различных каталитических субъединиц протеасом — важный параметр, отражающий не только физиологическое состояние органа и ткани, наличие воспаления или стресса, но, скорее всего, и пока до конца неохарактеризованные регуляторные механизмы, поддерживающие тканеспецифические функции в клетках. В этой связи количественная оценка и сравнительный анализ уровней

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

экспрессии протеасомных генов представляет особый интерес.

Ранее, на основе метода ПЦР в реальном времени, нами была разработана система, позволяющая количественно оценивать и сравнивать между собой уровни экспрессии протеасомных генов человека [11]. Теперь нами разработана новая система для проведения ПЦР в реальном времени и измерения абсолютных уровней экспрессии генов протеасом мыши — основного модельного объекта для изучения особенностей патогенеза различных заболеваний, включая нейродегенеративные патологии человека. Используя данную систему, мы провели эксперименты по сравнительному анализу уровней экспрессии протеасомных субъединиц в образцах различных отделов ЦНС мышей линии C57Bl.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные животные и диссекция отделов ЦНС. Мышей линии C57Bl содержали в SPF (Specific Pathogen Free) виварии не более 5 особей в клетке в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч темного и 12 ч светлого времени) при температуре 22–26°С и свободном доступе к корму и воде. Работы с животными проводили в соответствии с "Правилами лабораторной практики в Российской Федерации" от 1.04.2016 № 199н.

Для экспериментов были отобраны только 60дневные самцы. Эвтаназию животных проводили методом цервикальной дислокации, извлекали головной мозг и отделы спинного мозга и препарировали анализируемые ткани на закрытой чашке Петри со льдом. Диссектированные отделы ЦНС замораживали в жидком азоте и помещали на хранение при -80°С.

Выделение тотальной РНК и синтез кДНК. Экстракцию тотальной РНК проводили с помощью реактива Extract RNA ("Евроген", Россия), следуя инструкции производителя. Спиртовое осаждение РНК проводили в присутствии 40 мкг гликогена ("Thermo Fisher Scientific", США). Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 ("Thermo Fisher Scientific"). Качество РНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе Agilent Bioanalyzer 2100 и набора Agilent RNA 6000 Nano kit ("Agilent Technologies", США). Число целостности РНК (RNA integrity number; RIN) для выделенной тотальной РНК составляло не менее 8 единиц.

Далее тотальную РНК обрабатывали Turbo DNase из набора Turbo DNA-free kit ("Ambion", США) и проводили реакцию обратной транскрипции, используя 1 мкг тотальной РНК, олиго(dT)-праймер и обратную транскриптазу MMLV из набора MMLV RT kit ("Евроген", Россия). Реакцию проводили при 42° С в течение 80 мин, после чего образцы инкубировали 10 мин при 70° С для инактивации ревертазы.

Подбор праймеров, амплификация фрагментов целевых генов, клонирование и выделение плазмидной ДНК. Последовательности транскриптов протеасомных субъединиц мыши взяты из GenBank. Подбор геноспецифичных праймеров проводили с помощью программы NCBI Primer Blast (PMID: 22708584) так, чтобы прямой и обратный праймеры соответствовали фрагментам из разных экзонов мРНК, длина ампликона составляла 90–200 п.н., температура плавления (*T*_m) – 60–62°С. Праймеры, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Амплификацию фрагментов мРНК генов субъелиниш протеасом проводили с матрицы кДНК. приготовленной из тотальной РНК. Тотальную РНК выделяли из клеток образца печени мыши. Амплификацию проводили с помощью смеси термостабильных ДНК-полимераз из набора Encyclo Plus PCR kit ("Евроген"), обладающих высоко-процессивной 5' → 3' ДНК-полимеразной активностью, а также корректирующей $3' \rightarrow 5'$ экзонуклеазной активностью, на амплификаторе МЈ Mini ("Bio-Rad", США). Число циклов амплификации рассчитывали эмпирически в соответствии с уровнем экспрессии гена. Далее полученные ампликоны очищали от компонентов реакции ПЦР с помощью QIAquick Gel Extraction Kit ("QIAGEN", Германия) и клонировали в вектор pAL2-Т ("Евроген"). Для трансформации использовали компетентные клетки Escherichia coli, штамм DH5α. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора Plasmid Miniprep ("QIAGEN"). Наличие вставки фрагментов мРНК протеасомных субъединиц проверяли с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Определение абсолютного количества транскриптов субъединиц протеасом с помощью ПЦР с использованием стандартной кривой. ПЦР в реальном времени проводили на приборе ABI PRISM® 7500 ("Applied Biosystems"), используя реакционную смесь qPCRmix-HS LowROX ("Евроген"). В каждую реакцию (V = 15 мкл) добавляли по 3 мкл 5× реакционной смеси, по 0.15 мкл каждого праймера в концентрации 10 мкМ и по 1 мкл кДНК (1/20 часть от общего объема синтезированной кДНК). Детекцию продуктов амплификации осуществляли с помощью интеркалирующего красителя Eva Green ("Biotium", США). Число копий мРНК определяли в абсолютных значениях, использую стандартные разведения плазмидной ДНК. Число копий плазмидной ДНК рассчитывали по формуле:

$$N = (m \times 6.022 \times 10^{23}) / (l \times 10^9 \times 650), \tag{1}$$

где *N* – число копий плазмидной ДНК, *m* – масса ДНК (нг), 6.022 × 10²³ – число Авогадро, *l* – длина

молекулы ДНК в парах нуклеотидов $\times 10^9$ (для преобразования массы в нг) $\times 650$ (средняя молекулярная масса пары нуклеотидов, Да).

Разведение плазмидной ДНК проводили в буфере TN (10 мМ Трис-HCl, pH 7.6, 10 мМ NaCl), содержащем ДНК из спермы лосося ("Sigma", США) в концентрации 100 нг/мкл. Эффективность амплификации определяли по наклону стандартной кривой в серии последовательных разведений плазмидной ДНК по формуле:

$$\mathbf{E} = (10^{-1/tg\alpha} - 1) \times 100, \tag{2}$$

где E — эффективность амплификации (%), tgα — tg угла наклона кривой.

Эффективность амплификации составляла не менее 90%. Исходя из того, что на одну ПЦР использовали 1/20 часть кДНК, синтезированной из 1 мкг тотальной РНК, итоговое число копий протеасомных субъединиц рассчитывали умножением полученного значения на 20. Для оценки значимости наблюдаемых изменений использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением критерия Тьюки в качестве поправки на множественные сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Разработка системы ПЦР в реальном времени

Для анализа уровней экспрессии генов PSMB5, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMB9 и PSMB10 каталитических субъединиц протеасом были подобраны специфические олигонуклеотиды, удовлетворяющие условиям: длина ампликона – 90–200 п.н., $T_{\rm m}$ – 60–62°С (табл. 1). Кроме того, оценивали термодинамические параметры: свободную энергию Гиббса образования гомодимеров, шпилек и гетеродимеров праймеров (табл. 1). Показано, что значения ΔG образования шпилек и гомодимеров для отдельных олигонуклеотидов, а также гетеродимеров праймеров для амплификации фрагмента одного гена было не ниже -8 ккал/моль. На следующем этапе работы проводили оценку специфичности ПЦР-амплификации участков целевых генов. В качестве матрицы использовали кДНК, синтезированную на тотальной РНК из клеток печени мыши. Продукты ПЦР анализировали в 2%-ном агарозном геле, после чего их выделяли и проводили двунаправленное секвенирование. Показана высокая специфичность разработанного набора праймеров (рис. 1).

Полученные фрагменты клонировали в вектор pAL2-Т. Плазмиды нарабатывали в клетках *E. coli*, после чего выделяли, очищали и определяли концентрацию. Затем с помощью онлайн-ресурca EndMemo (http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php) определяли число копий вектора в единице объема. Далее проводили подбор опти-

Термодинамические	Гетеродимеры, ΔG не менее, ккал/моль	7 02	ce:	CC 9	70°C-	102	10./	77 7	t 0. t	00 9		10 2	10./_
Tel	Гомодимеры и шпильки, ΔG не менее, ккал/моль	-3.61	-3.61	-3.61	-6.5	-5.38	-7.05	-3.14	-5.38	-3.61	-6.34	-3.61	-3.14
	$T_{\mathrm{m}}, ^{\circ}\mathrm{C}$	63.6	63.6	64.8	63.3	64.6	62.8	65.2	60.0	63.9	64.3	62.6	63.9
	Размер ампликона, п.н.		Экзон–экзон	197	Экзон–экзон	105	Экзон–экзон	187	Экзон–экзон	156	Экзон–экзон	94 <u>Avaou – avaou</u>	HOCAC - HOCAC
	Положение по референсной мРНК	NM_011186.1 п.н. 391–410	NM_011186.1 п.н. 538—520	NM_008946.4 п.н. 605—624	NM_008946.4 п.н. 801–782	NM_011187.1 п.н. 511–530	NM_011187.1 п.н. 615—596	NM_010724.2 п.н. 199—218	NM_010724.2 п.н. 385–366	NM_013585.2 п.н. 350–369	NM_013585.2 п.н. 505—486	NM_013640.3 п.н. 803—822	NM_013640.3 п.н. 896-878
оте	Длина, п.н.	20	19	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19
гонуклеотиды, использованные в раб	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	TAAGGAACGCATCTCGGTCG	GTTCCCCTCGCTGTCTACG	ACTGCCAATGCTCTCGCTTT	CGTCGGTATGGACCATCCTT	CATGGGTTCTGGCTCCTTGG	GCTGCAATAGCCTCACTCAC	TGCCTATGGGGGTGATGGACA	CGTCTTCCTTCATGTGGTAC	ACCGTGAGGACTTGTTAGCG	AAGCTGCGTCCACATAACCA	GGCTTGTGTTCCGAGATGG	CAGCCCCACAGCAGTAGATT
Таблица 1. Оли	Праймер	PSMB5 for	PSMB5 rev	PSMB6 for	PSMB6 rev	PSMB7 for	PSMB7 rev	PSMB8 for	PSMB8 rev	SMB9 for	PSMB9 rev	SMB10 for	SMB10 rev

ОТДЕЛЫ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ МЫШИ

57

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 **№** 1





Рис. 1. Оценка специфичности отжига праймеров на последовательности протеасомных генов мыши. Электрофорез в 2%-ном агарозном геле продуктов амплификации при использовании праймеров к протеасомным субъединицам мыши. В качестве матрицы использована кДНК, синтезированная на тотальной РНК из клеток печени мыши. $T_{\rm m} = 62^{\circ}$ С, количественное определение продуктов реакции проводили после 30 циклов амплификации. М – маркеры длин ДНК (п.н.)

мальных параметров проведения реакции и оценку эффективности амплификации целевых фрагментов методом ПЦР в реальном времени. В качестве матрицы использовали серии последовательных разведений полученных плазмид (от 100 копий до 10 млн копий), содержащих последовательности транскриптов PSMB5, PSMB6, PSMB7, PSMB8, PSMB9 и PSMB10 мыши. В ходе экспериментов определены оптимальные параметры проведения реакции, эффективность и чувствительность, подтверждена специфичность (по анализу кривых плавления) системы (рис. 2). Средняя эффективность амплификации праймеров, рассчитанная по формуле (2), составила 98.3%; с минимальной (92.8%) для гена РЅМВ6 (рис. 2). Таким образом, получена и откалибрована система, позволяющая проводить точное измерение числа ко-



Рис. 2. Оценка эффективности амплификации праймеров к генам протеасом мыши. Зависимость порогового цикла амплификации (C_t) от числа копий матрицы (*N*) представлена для каждой исследованной пары праймеров. Анализ проведен в серии последовательных разведений плазмиды (от 100 копий до 10 млн копий), содержащей вставку последовательности транскриптов *PSMB3*, *PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*, *PSMB8*, *PSMB9* или *PSMB10* мыши. Эффективность амплификации праймеров рассчитана по формуле (2).



Рис. 3. Число копий транскриптов генов протеасомных субъединиц в коре головного мозга, гиппокампе, мозжечке и спинном мозге мыши. Число копий указано для 1 мкг тотальной РНК. Точки на диаграмме отражают число транскриптов протеасомных субъединиц у индивидуальных особей. Выборка для анализа в гиппокампе, мозжечке и спинном мозге составила 5 особей, в коре головного мозга – 6 особей.

пий транскриптов протеасомных субъединиц в тканях мышей.

Количественный анализ экспрессии генов субъединиц протеасом в различных отделах ЦНС мыши

Используя полученную систему, мы провели сравнительный анализ экспрессии генов протеолитических субъединиц протеасом в различных отделах ЦНС. Изучена экспрессия генов субъединиц протеасом в коре, спинном мозге, гиппокампе и мозжечке самцов мышей линии C57Bl в возрасте 60 дней.

Во всех исследованных отделах ЦНС наиболее высокие уровни экспрессии выявлены для генов, кодирующих конститутивные каталитические субъединицы протеасом: *PSMB6* (медиана от 7.5 до 20.3 млн копий на 1 мкг тотальной РНК) и *PSMB7* (медиана от 9.5 до 17.8 млн копий на 1 мкг тотальной РНК). Наименьший уровень экспрессии среди конститутивных субъединиц выявлен для гена *PSMB5* (медиана от 4 до 9.5 млн копий на 1 мкг тотальной РНК). На основании этих данных можно предположить, что в исследованных отделах ЦНС среди каталитических субъединиц β5 ограничивает скорость сборки протеасом. Эти результаты хорошо согласуются с данными о критически важной роли субъединицы В5 и ее пропептида, выполняющих роль молекулярного шаперона в процессе сборки протеасом [12]. Уровни экспрессии генов иммунных субъединиц *PSMB8* и *PSMB9* были в среднем в 10–70 раз ниже уровней экспрессии конститутивных субъединиц и составляли от 0.2 до 0.6 млн копий и от 0.1 до 0.3 млн копий (медиана значений) на 1 мкг РНК соответственно (рис. 3). В тоже время среди иммунных субъединиц следует выделить ген PSMB10, кодирующий субъединицу β2i. В сравнении с генами PSMB8 и PSMB9 уровень экспрессии PSMB10 был существенно выше и достигал значений, сравнимых с конститутивными субъединицами: от 1 до ~5 млн копий (медиана значений) на 1 мкг тотальной РНК (рис. 3). На основании полученных результатов можно говорить о преобладании конститутивных протеасом в различных отделах ЦНС, а различные уровни экспрессии генов иммунных субъединиц могут отражать присутствие как иммунных, так и промежуточных протеасом (протеасом, содержащих как конститутивные, так и иммунные каталитические субъединицы).

При сравнении количественных данных по общим уровням экспрессии генов межу отделами ЦНС последние удалось разделить на две катего-

ФУНИКОВ и др.



Рис. 4. Сравнительный анализ экспрессии генов конститутивных (*PSMB5*, *PSMB6* и *PSMB7*) и иммунных (*PSMB8*, *PSMB9* и *PSMB10*) субъединиц протеасом в тканях ЦНС мыши. Число копий указано для 1 мкг тотальной РНК. Выборка для анализа в гиппокампе, мозжечке и спинном мозге составила 5 особей, в коре головного мозга – 6 особей. Точки на диаграмме отражают число транскриптов протеасомных субъединиц у индивидуальных особей. *p < 0.05; **p < 0.01 (ANOVA, критерий Тьюки).

рии: с условно "высокими" (кора и спинной мозг) и "низкими" (гиппокамп и мозжечок) уровнями экспрессии генов субъединиц протеасом. Так, различия между отделами с высокими и низкими уровнями экспрессии достигали 2-2.5 раза для генов PSMB6 и PSMB7, от 1.7 до 3 раз для PSMB8 и PSMB9 и от 1.5 до 5 раз для PSMB10 (рис. 3). Таким образом, в разных отделах ЦНС необходимость в количестве протеасом в клетках может сильно различаться. В тоже время при анализе соотношений уровней экспрессии генов между собой можно выделить отделы ЦНС, имеющие близкие профили экспрессии генов субъединиц. Так, несмотря на существенные отличия по числу транскриптов, можно отметить близкие паттерны в коре головного мозга и мозжечке, несколько отличающийся профиль экспрессии генов в спинном мозге и существенно отличающийся в гиппокампе (рис. 3). На основании этих данных можно предполагать, что в отделах ЦНС с близкими профилями экспрессии генов протеасом имеется близкий набор различных форм протеасом, хотя их общее содержание может сильно отличаться.

Сравнивая уровни экспрессии конкретных генов в разных отделах ЦНС, можно также выявить некоторые закономерности. Так, соотношения уровней экспрессии генов укладываются в два основных паттерна. Один представлен генами *PSMB6* и *PSMB7*, где наименьшие уровни выявлены в гиппокампе, более высокие уровни в мозжечке, далее в коре и, наконец, самые высокие в образцах спинного мозга (рис. 4). Примечательно, что уровень экспрессии РЅМВ6 в гиппокампе был существенно ниже (2-2.5 раза, p < 0.01, ANOVA, критерий Тьюки), чем в других отделах ЦНС, – в них различия в экспрессии были гораздо меньше (рис. 4). Для гена *PSMB7* уровни экспрессии в гиппокампе и мозжечке отличались незначительно, однако в спинном мозге были в 1.5-2 раза выше по сравнению с другими отделами ЦНС (*p* < 0.01, ANOVA, критерий Тьюки) (рис. 4). Для генов *PSMB5*, *PSMB8*, *PSMB9* и *PSMB10* выявлены другие особенности. Для этой группы ге-

нов самый низкий уровень экспрессии детектировали в мозжечке, затем по возрастающей: гиппокамп \rightarrow спинной мозг \rightarrow кора (рис. 4). В случае **PSMB5** уровни экспрессии в мозжечке и спинном мозге были соизмеримы, в то время как отличия между остальными исследованными отделами ЦНС составляли 1.5-2 раза (p < 0.01, ANOVA, критерий Тьюки). Для генов, кодирующих иммунные субъединицы протеасом, уровень экспрессии PSMB8 был выше приблизительно в 2 раза, *PSMB9* в 2.5–3 и *PSMB10* в 2–4 раза (*p* < 0.01, ANOVA, критерий Тьюки) в коре головного мозга по сравнению с остальными исследованными отделами ЦНС (рис. 4). Наряду с этим уровни экспрессии PSMB8 в гиппокампе и спинном мозге, а также *PSMB9* в гиппокампе и мозжечке сушественно не отличались. Интересно наличие как генов, кодирующих конститутивные (*PSMB5*), так и иммунные каталитические субъединицы во второй группе. По-видимому, это свидетельствует о наличии общих механизмов регуляции экспрессии каждой из выделенных групп генов в различных отлелах ШНС.

В заключение мы провели сравнительный анализ опубликованных данных транскриптомов образцов спинного мозга, коры головного мозга, мозжечка и гиппокампа мышей [13–15] и выяснили, что полученные нами результаты хорошо согласуются с данными транскриптомных исследований (данные не приведены).

В ЦНС наряду с деградацией белка протеасомы выполняют еще несколько важных функций. Как уже отмечалось выше, протеасомы поставляют пептиды для презентации комплексов с молекулами МНС-І. Презентация таких комплексов на мембране клеток имеет принципиальное значение для клеточного иммунитета, однако, как выяснилось, в ЦНС это также необходимо для регуляции многих процессов развития мозга, включая рост нейритов, образование и функционирование синапсов, долгосрочную и гомеостатическую пластичность, а также зависящую от активности реорганизацию синапсов [16, 17]. Кроме того, недавно выявлена важная роль протеасом в межнейронных коммуникациях. Показано, что в мембраны нейронов встроены 20S протеасомы, которые разрушают специфические полипептиды с образованием биологически активных пептидов, регулирующих активацию соседних нейронов [18, 19]. Ramachandran и соавт. [18] обращают внимание на наличие в мембранах нейронов как протеасом с конститутивными, так и с иммунными бетасубъединицами. Огге и соавт. [20] показали, что при активации клеток микроглии вследствие развития воспаления или нейродегенерации увеличивается экспрессия иммунных субъединиц протеасом. Результаты этих исследований свидетельствуют о значимости баланса уровней экспрессии генов каталитических субъединиц протеасом в ЦНС, что имеет не только фундаментальное научное значение, но и прикладное – например в диагностике нейродегенеративных заболеваний.

На основании полученных нами результатов можно сделать несколько важных выводов.

Во-первых, в отделах ЦНС мышей линии C57Bl преобладают конститутивные протеасомы, в тоже время в существенно меньших количествах, по-видимому, присутствуют промежуточные и иммунные протеасомы.

Во-вторых, по соотношению уровней экспрессии генов протеасом в целом различные отделы ЦНС можно разделить на отделы с условно "высоким" и "низким" уровнями экспрессии. Можно предполагать, что в отделах, составляющих одну группу, функциональная нагрузка на протеасомы сопоставима. Это может включать общие соотношения определенных субстратов протеасом внутри клеток, необходимость в производстве соизмеримого количества пептидов для обеспечения межнейронных взаимодействий [19], а также соответствующих пептидов, вовлеченных в пептидзависимые механизмы регуляции процессов внутри клеток [10].

В-третьих, при анализе соотношений уровней экспрессии генов между собой можно выделить отделы ЦНС, имеющие близкие профили экспрессии генов субъединиц; при этом число копий транскриптов для каждого конкретного гена в этих отделах может сильно различаться. Это значит, что в отделах с близкими профилями экспрессии генов протеасом, вероятно, имеется близкий набор различных форм протеасом; при этом их общее содержание может сильно отличаться. Однако важно обратить внимание на то, что экспрессия генов протеасом на транскрипционном уровне (мРНК) далеко не всегда коррелирует с посттрансляционным, то есть с экспрессией соответствующих белков, что было показано для иммунных субъединиц протеасом [21].

В-четвертых, можно выделить группы генов, экспрессия которых обладает общим паттерном изменений в разных отделах ЦНС, что указывает на вероятное наличие общих механизмов регуляции для каждой из выделенных групп генов в этих отделах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время анализ транскриптома с использованием технологии секвенирования нового поколения становится основным методом для характеристики уровней экспрессии генов в клетках и тканях. Однако для более быстрого и точного количественного анализа метод ПЦР в реальном времени по-прежнему остается "золотым стандартом" в исследовании уровней экспрессии генов. Нами разработана и протестирована система для количественного определения абсолютного содержания транскриптов конститутивных и иммунных каталитических субъединиц протеасом мыши. Используя эту систему, мы исследовали экспрессию генов субъединиц протеасом в образцах различных отделов ЦНС мыши. Обнаружены существенные различия по уровням экспрессии генов протеасом между разными отделами ЦНС. Их биологическую значимость предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ №18-74-10095. Содержание животных обеспечено программой поддержки биоресурсных коллекций ИФАВ РАН (ФАНО №0090-2017-0016).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D., Huber R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. *Nature*. 386(6624), 463–471.
- Heinemeyer W., Fischer M., Krimmer T., Stachon U., Wolf D.H. (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* 272, 25200–25209.
- Rousseau A., Bertolotti A. (2018) Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19(11), 697–712.
- Dantuma N.P., Bott L.C. (2014) The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 70.
- Morozov A.V., Karpov V.L. (2019) Proteasomes and several aspects of their heterogeneity relevant to cancer. *Front. Oncol.* 9, 761.
- Kors S., Geijtenbeek K., Reits E., Schipper-Krom S. (2019) Regulation of proteasome activity by (post-) transcriptional mechanisms. *Front. Mol. Biosci.* 6, 48.
- 7. Pickering A.M., Koop A.L., Teoh C.Y., Ermak G., Grune T., Davies K.J. (2010) The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$ proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.* **432**, 585–594.
- Ferrington D.A., Gregerson D.S. (2012) Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 109, 75–112.
- Guillaume B., Chapiro J., Stroobant V., Colau D., Van Holle B., Parvizi G., Bousquet-Dubouch M.-P., Théate I., Parmentier N., Van den Eynde B. J. (2010) Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 18599–18604.

- Morozov A.V., Karpov V.L. (2018) Biological consequences of structural and functional proteasome diversity. *Heliyon*. 4(10), e00894.
- Морозов А.В., Буров Б.А., Карпов В.Л. (2019) Динамика функциональной активности и экспрессии субъединиц протеасом в условиях адаптации клетки к тепловому шоку. *Молекуляр. биология.* 53(4), 638–647.
- Kunjappu M.J., Hochstrasser M. (2014) Assembly of the 20S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta.* 1843(1), 2–12.
- Cembrowski M.S., Wang L., Sugino K., Shields B.C., Spruston N. (2016) Hipposeq: a comprehensive RNAseq database of gene expression in hippocampal principal neurons. *eLife*. 5, e14997.
- Funikov S.Y., Rezvykh A.P., Mazin P.V., Morozov A.V., Maltsev A.V., Chicheva M.M., Vikhareva E.A., Evgen'ev M.B., Ustyugov A.A. (2018) FUS(1–359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy. *Neurogenetics*. 19(3), 189–204.
- Liu Q., Huang S., Yin P., Yang S., Zhang J., Jing L., Cheng S., Tang B., Li X-J., Pan Y., Li S. (2020) Cerebellum-enriched protein INPP5A contributes to selective neuropathology in mouse model of spinocerebellar ataxias type 17. *Nat. Commun.* 11(1), 1101.
- Corriveau R.A., Huh G.S., Shatz C.J. (1998) Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity. *Neuron.* 21(3), 505–520.
- McAllister A.K. (2014) Major histocompatibility complex I in brain development and schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. **75**(4), 262–268.
- Ramachandran K.V., Margolis S.S. (2017) A mammalian nervous-system-specific plasma membrane proteasome complex that modulates neuronal function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24(4), 419–430.
- Ramachandran K.V., Fu J.M., Schaffer T.B., Na C.H., Delannoy M., Margolis S.S. (2018) Activity-dependent degradation of the nascentome by the neuronal membrane proteasome. *Mol. Cell.* **71**(1), 169–177.e6.
- Orre M., Kamphuis W., Dooves S., Kooijman L., Chan E.T., Kirk C.J., Dimayuga Smith V., Koot S., Mamber C., Jansen A.H., Ovaa H., Hol E.M. (2013) Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease. *Brain*. 136(5), 1415–1431.
- Frentzel S., Kuhn-Hartmann I., Gernold M., Gött P., Seelig A., Kloetzel P.M. (1993) The major-histocompatibility-complex-encoded beta-type proteasome subunits LMP2 and LMP7. Evidence that LMP2 and LMP7 are synthesized as proproteins and that cellular levels of both mRNA and LMP-containing 20S proteasomes are differentially regulated. *Eur. J. Biochem.* 216(1), 119–126.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

THE NUMBER OF PROTEASOME GENE TRANSCRIPTS DIFFERS BETWEEN PARTS OF THE MOUSE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

S. Yu. Funikov¹, D. S. Spasskaya¹, A. V. Burov^{1, 2}, E. V. Teterina³, A. A. Ustyugov³, V. L. Karpov¹, and A. V. Morozov¹, *

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia ²Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia ³Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow region, 142432 Russia

*e-mail: Runkel@inbox.ru

The proteasome is a multisubunit protein complex, which degrades most intracellular proteins. Of the 14 20S proteasome subunits, three: β_1 , β_2 and β_5 have catalytic activity and hydrolyze the peptide bond after acidic, basic and hydrophobic amino acids, respectively. In proteasomes, constitutive catalytic subunits β_1 , β_2 and β 5 can be replaced by the so-called immune subunits β 1i, β 2i, and β 5i. However, certain forms of proteasomes contain both immune and constitutive subunits. The incorporation of immune subunits changes the profile of peptides produced by proteasomes, which is important for the processes of antigen presentation and cellular response to stress and, apparently, in a number of intracellular signaling pathways. Here, we developed a real-time PCR-based system for the quantitative analysis of constitutive and immune proteasome subunits genes expression levels in the murine samples. Using the obtained system, expression levels of proteasome subunits genes in the tissues of the central nervous system (CNS) were investigated. It was revealed that the number of transcripts corresponding to the catalytic subunits of proteasomes differs significantly between different parts of the CNS. These results allow us to subdivide the studied brain regions into two categories, conditionally with "high" (cerebral cortex and spinal cord) and "low" (hippocampus and cerebellum) levels of gene expression of proteasome subunits. Moreover, it is possible to distinguish parts with close and significantly different gene expression profiles of catalytic proteasome subunits. Thus, gene expression profiles in the cortex, spinal cord, and cerebellum are similar to each other, but differ from the expression profile in the hippocampus. The results likely indicate differences in the pool of proteasomes, as well as in the functional load on the ubiquitin-proteasome system in different parts of the central nervous system.

Keywords: ubiquitin-proteasome system, proteasome, immunoproteasome

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТРАНСПОРТЕРОВ АВСА1 И АВСG1 И ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ РРАRγ, LXRβ И RORα В ПОДКОЖНОЙ И ВИСЦЕРАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ У ЖЕНЩИН С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

© 2021 г. А. А. Пантелеева^{*a*, *b*}, Н. Д. Разгильдина^{*a*}, Д. Л. Бровин^{*b*}, И. А. Побожева^{*a*, *b*}, К. В. Драчева^{*a*}, О. А. Беркович^{*b*}, Е. А. Полякова^{*b*}, О. Д. Беляева^{*b*}, Е. И. Баранова^{*b*}, С. Н. Пчелина^{*a*, *b*}, В. В. Мирошникова^{*a*, *b*}, *

^аПетербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Гатчина, 188300 Россия

^bПервый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, 197022 Россия

> *e-mail: v.v.mirosh@gmail.com Поступила в редакцию 29.04.2020 г. После доработки 27.07.2020 г. Принята к публикации 28.07.2020 г.

Изучена экспрессия генов транспортеров холестерина ABCA1 и ABCG1, а также генов PPARG, LXRB (NR1H2) и RORA, колирующих наиболее важные транскрипционные регуляторы метаболизма липидов, в подкожной и висцеральной жировой ткани женщин с метаболическим синдромом. Показано, что соотношение уровней мРНК гена *АВСС1* в подкожной и висцеральной жировой ткани снижается с возрастом и коррелирует с развитием симптомокомплекса метаболический синдром. Женщины, у которых экспрессия гена АВССІ в подкожной жировой ткани выше, чем в висцеральной (с учетом коррекции по возрасту), имеют более низкие шансы развития метаболического синдрома, чем женщины, у которых экспрессия этого гена в висцеральной жировой ткани выше или сравнима с экспрессией в подкожной жировой ткани: OR = 0.15 (95% ДИ 0.03-0.76), p = 0.023. Соотношение уровня мРНК гена ABCA1 в подкожной и висцеральной жировой ткани положительно коррелировало с уровнем холестерина ЛПВП плазмы крови, в том числе после коррекции по возрасту. Лица с повышенным уровнем мРНК гена АВСАІ в подкожной жировой ткани относительно висцеральной имели более высокий уровень ЛПВП. Уровень мРНК гена ABCA1 в полкожной жировой ткани был снижен у курящих (р = 0.001). Наблюдалась отрицательная корреляция уровня мРНК гена *PPARG* в подкожной жировой ткани с индексом массы тела и с окружностью талии в общей выборке ($\beta = -0.602$, p = 0.003 и $\beta = -0.642$, p = 0.001 соответственно, с учетом коррекции по возрасту). Снижение соотношения уровня мРНК гена *РРАRG* в подкожной и висцеральной жировой ткани ассоциировано с увеличением уровня инсулина в плазме крови и индекса инсулинорезистентности HOMA-IR (β = -0.819, *p* = 0.004 μ β = -1.053, *p* = 0.008 соответственно, с учетом коррекции по возрасту). Таким образом, соотношение экспрессии генов ABCA1, ABCG1 и PPARG в различных типах жировой ткани может быть значимым прогностическим фактором развития атерогенной дислипидемии, метаболического синдрома и инсулинорезистентности при ожидении.

Ключевые слова: ожирение, метаболический синдром, транспортеры холестерина ABCA1 и ABCG1, PPARγ

DOI: 10.31857/S0026898421010134

ВВЕДЕНИЕ

Абдоминальное ожирение ассоциировано с развитием спектра метаболических нарушений — инсулинорезистентности, атерогенной дислипидемии, артериальной гипертензии — т.е. с формированием симптомокомплекса метаболический синдром (MC) [1]. Согласно современным представлениям в основе причинно-следственной связи "ожирение–MC" лежит дисфункция жировой ткани [2]. Предложено несколько возможных механизмов патогенеза MC, в том числе

Сокращения: ВЖТ – висцеральная жировая ткань; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; МС – метаболический синдром; ОТХ – обратный транспорт холестерина; ПЖТ – подкожная жировая ткань; ХС – холестерин; HOMA-IR – индекс инсулинорезистентности.

хроническое воспаление жировой ткани, на фоне которого развивается дисбаланс секреции провоспалительных и противовоспалительных, чувствительных к инсулину адипоцитокинов, инсулинорезистентность, увеличивается концентрация ненасыщенных жирных кислот, повышается секреция липопротеинов очень низкой плотности в печени [3]. Однако инициирующий этап этих нарушений не известен. Одно из предположений связано со значительным повышением содержания холестерина (ХС) в адипоцитах при ожирении, что может приводить к их дисфункции, развитию МС, ассоциированного с гиперхолестеринемией и снижением концентрации липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) [4–7].

Жировая ткань, представляющая собой энергетическое депо, в котором энергия запасается в виде триглицеридов, одновременно служит самым большим "резервуаром" ХС в организме, что подчеркивает ее значимую роль в поддержании общего гомеостаза ХС. Жировая ткань также может вносить вклад в уровень ЛПВП плазмы крови, основная функция которых состоит в обратном транспорте холестерина (ОТХ) [8]. АТР-связывающие трансмембранные транспортеры семейства ABC – ABCA1 и ABCG1, координирующие элиминацию ХС из клеток, играют ключевую роль в регуляции содержания ХС в адипоцитах [7, 9]. АВСА1 участвует в биогенезе ЛПВП на этапе формирования незрелых частиц пре-бета-ЛПВП, в то время как транспортер ABCG1 осуществляет насыщение ХС зрелых ЛПВП [10]. Показано, что транспортер АВСА1 принимает участие в синтезе ЛПВП в жировой ткани [3, 11]. Специфический нокаут гена Abcal в адипоцитах мыши приводит к развитию инсулинорезистентности и ожирения, у этих мышей наблюдали также снижение циркуляции активной формы адипонектина [12]. Транспортер ABCG1 играет важную роль в адипогенезе, контроле содержания ХС в жировой ткани, регуляции активности липопротеинлипазы и запасания триглицеридов [9, 13, 14]. Экспрессия ABCG1 считается критическим фактором в контроле воспаления и снижении продукции провоспалительных цитокинов в жировой ткани [14]. Можно предположить, что вариации экспрессии генов *ABCA1* и *ABCG1* в адипоцитах могут приводить к дисбалансу между поступлением ХС и его элиминацией, т.е. к нарушению ОТХ из адипоцитов и, следовательно, к накоплению ХС в жировой ткани.

Важную роль в контроле метаболизма XC в жировой ткани играют факторы транскрипции PPARγ, LXR и RORα [15–17]. Ген *PPARG* кодирует рецептор гамма, активируемый пролифератором пероксисом (PPARγ), — основной транскрипционный фактор, который участвует в регуляции адипогенеза, управляя экспрессией генов, вовлеченных в различные метаболические про-

цессы и в механизмы дифференцировки и роста жировых клеток [17]. Печеночные Х-рецепторы (LXR) выступают как сенсоры XC и увеличивают экспрессию генов, вовлеченных в удаление XC и других липидов из клеток [18]. РРАRү может индуцировать экспрессию генов *ABCA1* и *ABCG1* и стимулировать отток XC из клеток путем активации ядерных факторов LXR [19]. Орфанный рецептор альфа ретиноевой кислоты – ROR α – выступает как антагонист РРАRү и LXR, играя важную роль в метаболизме глюкозы и липидов, в том числе путем модуляции экспрессии генов *ABCA1* и *ABCG1* [15, 20, 21].

Ранее мы показали, что, несмотря на положительную корреляцию степени ожирения с уровнем мРНК генов *ABCA1* и *ABCG1*, при ожирении не наблюдается повышения содержания белков ABCA1 и ABCG1 в висцеральной жировой ткани (BЖТ) [22]. Развитие сопутствующих ожирению патологий, в том числе MC, связывают с патологическим разрастанием именно ВЖТ, тогда как подкожная жировая ткань (ПЖТ) играет протективную роль [23, 24]. Установлено, что количественное соотношение ВЖТ/ПЖТ можно рассматривать как предиктор развития метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний [25, 26].

Мы предположили, что уровень экспрессии генов *ABCA1* и *ABCG1* в ПЖТ и ВЖТ может отражать нарушение процесса ОТХ в жировой ткани и, соответственно, быть значимым фактором, ассоциированным с развитием ожирения, атерогенной дислипидемии и, как следствие, с МС. Цель нашей работы состояла в оценке уровня экспрессии генов *ABCA1* и *ABCG1*, а также генов факторов транскрипции, участвующих в их регуляции, в парных образцах ПЖТ и ВЖТ при метаболически здоровом ожирении и МС у женщин.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Обследовано 62 женщины (средний возраст 49.08 ± 12.17 лет, медиана 48.5(28-74)), у которых во время плановых оперативных вмешательств в условиях общей анестезии (по поводу желчнокаменной болезни, грыжи передней брюшной стенки) произведен забор образцов ПЖТ (параумбиликальная область) и ВЖТ (большой сальник). Для установления диагноза МС использовали критерии JIS2009, измеряли рост, вес, окружность талии, артериальное давление, определяли концентрацию глюкозы плазмы крови натощак, инсулина, показатели липилного спектра сыворотки крови. Абдоминальное ожирение устанавливали при окружности талии >80 см. МС диагностировали при наличии не менее трех любых компонентов (абдоминальное ожирение, триглицериды ≥1.7 ммоль/л, ХС-ЛПВП <1.3 ммоль/л, артериальное давление ≥ 130/85 мм рт. ст. или ранее диагностированная артериальная гипертензия, глюкоза плазмы крови натощак ≥5.6 ммоль/л) [27, 28]. В результате обследования диагноз МС установлен у 36 пациенток. Группу сравнения составили 26 женщин без МС, среди которых выделены подгруппы: с абдоминальным ожирением (метаболически здоровое ожирение) и без избыточного веса. Проведение работы одобрено локальным этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова, все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Оценка относительного уровня мРНК исследуемых генов. Суммарную РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini columns ("Oiagen", Нидерланды). кДНК синтезировали с помощью набора Revert Aid First cDNA Synthesis kit ("Thermo Fisher Scientific", США). Чистоту препарата РНК оценивали по соотношению поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (критерий чистоты 2). Отсутствие деградации РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле по соотношению интенсивности полос, соответствующих 28S и 18S pPHK (2:1 при отсутствии деградации). Относительный уровень мРНК ге-HOB ABCA1, ABCG1, PPARG, LXRB (NR1H2), RORA определяли с помощью ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 Touch ("Bio-Rad", США) по методу, описанному ранее [22, 27]. Последовательности праймеров и зондов TaqMan подбирали таким образом, чтобы охватывать все значимые транскрипты, при этом праймеры располагались в соседних экзонах, а зонды отжигались в области экзонных стыков (табл. 1). Для обеспечения точности эксперимента все образцы измеряли как минимум в трех повторностях. Каждая плашка содержала контрольный образец (пулированная кДНК жировой ткани, полученной от представителей группы сравнения) и отрицательный контроль (без матрицы), соответственно, в трех повторах. Количество мРНК гена интереса нормировали по мРНК референсных генов АСТВ и RPLP0 [22].

Статистическая обработка. Статистический анализ проводили с использованием программ SPSS 17.0 и R-Studio. Соответствие данных нормальному распределению проверяли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Различия в уровне экспрессии генов в ПЖТ и ВЖТ оценивали с помощью критерия Уилкоксона. Для сравнения показателей в группах пациентов: 1) с МС и без MC – U-критерий Манна–Уитни; 2) с MC и двумя подгруппами лиц без МС, сформированными по принципу наличия абдоминального ожирения (табл. 2) — Н-критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением методом Данна. Коррекцию по возрасту проводили методом логистической регрессии (с введением в уравнение регрессии уровня экспрессии в качестве категориальной переменной, а возраста в

качестве коварианта) в случае предварительного выявления различий между группами. Корреляции между количественными характеристиками анализировали методом Спирмана. Выявленные корреляционные и ассоциативные взаимосвязи количественных характеристик (биохимические и антропометрические показатели) с уровнем/типом экспрессии генов с учетом возраста корректировали методом линейной регрессии. Статистически значимыми считали различия при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В табл. 2 представлены результаты антропометрического и биохимического обследования пациенток, которым была выполнена биопсия жировой ткани. Следует отметить, что пациентки с МС были старше, чем без МС, и различия между группами были значимыми по всем компонентам МС (табл. 2). Среди лиц без МС выделены подгруппы с абдоминальным ожирением (метаболически здоровое ожирение) и без избыточного веса и ожирения, которые различались по следующим параметрам: окружности талии, индексу массы тела, концентрации общего ХС плазмы крови, возрасту (табл. 2).

Результаты сравнительного анализа экспрессии генов представлены в табл. 3. С целью выявления различий в уровне экспрессии генов в зависимости от типа жировой ткани дополнительно оценивали соотношение уровня мРНК в ПЖТ и в ВЖТ (соотношение мРНК ПЖТ/ВЖТ).

Показаны различия в уровне экспрессии генов *PPARG* и *LXR* β в ПЖТ и ВЖТ: уровень мРНК в ПЖТ был выше, чем в ВЖТ (табл. 3; p = 0.008 и p = 0.001 в общей выборке). Уровни мРНК генов *ABCA1, ABCG1* и *RORA* в ПЖТ и ВЖТ не отличались. Однако следует отметить, что уровни мРНК генов *ABCA1* и *ABCG1*, а также соотношение мРНК ПЖТ/ВЖТ могут варьировать у конкретных индивидов. Соответственно, среди обследованных можно выделить как женщин с более высоким уровнем экспрессии генов *ABCA1* и *ABCG1* в ПЖТ по сравнению с ВЖТ, так и с более высокой экспрессией этих генов в ВЖТ. Эта особенность позволила провести расширенный анализ этих генов.

Сравнение групп выявило снижение уровня мРНК гена *ABCG1* в ПЖТ, а также соотношения мРНК ABCG1 ПЖТ/ВЖТ у женщин с МС по сравнению с женщинами без МС (p = 0.017 и p = 0.003 соответственно). Уровень мРНК гена *PPARG* в ПЖТ был снижен в группе с МС, а также в подгруппе с абдоминальным ожирением без МС по сравнению с лицами без избыточного веса и ожирения (p = 0.009 и p = 0.029 соответственно). Однако возрастные отличия исследуемых групп тре-

Ген	Последовательность (5' → 3') прямого и обратного праймеров и зонда	Референсная последовательность		
ABCA1	5'-CTCCTGTGGTGTTTCTGGATG-3' 5'-CTTGACAACACTTAGGGCACAA-3' 5' (FAM)-AAGCCCGGCGGTTCTTGTGG -3'(RTQ1)	NM_005502.4		
ABCG1	5'-CACGTACCTACAGTGGATGT-3' 5'-GTCTAAGCCATAGATGGAGA-3' 5' (FAM)-CTATGTCAGGTATGGGTTCGAAG-3'(RTQ1)	NM_016818.2 NM_004915.3 NM_207174.1 NM_207627.1 NM_207628.1 NM_207629.1		
RORA	5'-CTTTGATGGGAAGTATGCCAG-3' 5'-ATCTTCAGTCAGGTGCATAGAAC-3' 5'(FAM)-CGTCTTCAAATCCTTAGGTTGTGAAG-3'(RTQ1)	NM_002943.3 NM_134260.2 NM_134261.3 NM_134262.3		
<i>LXR</i> β (<i>NR1H2</i>)	5'-CTGTTGCTTGGAGAGGGGGC-3' 5'-CGTGGTAGGAGAGGGACATGG-3' 5'(FAM)-CTGGAGAGAGGGCTGCTCCGTGA-3'(RTQ1)	NM_001256647.2 NM_007121.7		
PPARG	5'-GATGTCTCATAATGCCATCACGTT-3' 5'-GGATTCAGCTGGTCGATATCACT-3' 5'(FAM)-CCAACAGCTTCTCCTTCTCGGCCTG-3'(RTQ1)	NM_001330615.4 NM_138712.4 NM_015869.5 NM_138711.4 NM_005037.6 NM_001330615.4 NM_001354666.2 NM_001354667.2 NM_001354668.2 NM_001354669.2 NM_001354670.2		
ACTB	5'-CGTGCTGCTGACCGAGG-3' 5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3' 5'(R6G)-CCAACCGCGAGAAGATGACCCAGAT-3'(BHQ1)	NM_001101.4		
RPLPO	5'-GATCAGGGACATGTTGCTGG-3' 5'-GACTTCACATGGGGGCAATGG-3' 5'(ROX)-CAATAAGGTGCCAGCTGCTGC-3'(RTQ2)	NM_001002.4 NM_053275.3		

Таблица 1. Праймеры и зонды, использованные в работе

бовали соответствующей коррекции всех результатов.

После коррекции по возрасту статистически значимыми остались только различия, выявленные для соотношения мРНК гена *ABCG1* ПЖТ/ВЖТ. Исходя из особенностей экспрессии генов *ABCA1* и *ABCG1* в жировой ткани, коррекция по возрасту для гена *ABCG1* проведена с представлением соотношения мРНК ПЖТ/ВЖТ в качестве категориальной переменной (К1, К2, К3), учитывающей три уровня: 1) экспрессия гена *ABCG1* в ПЖТ выше, чем в ВЖТ (соотношение мРНК ПЖТ/ВЖТ ≥ 1.5, или относительный уровень мРНК в ПЖТ превышает относительный уровень мРНК в ВЖТ как минимум на 50%); 2) экспрессия гена *ABCG1* в ПЖТ и ВЖТ сопоставима; 3) экспрессия гена *ABCG1* в ВЖТ выше, чем в ПЖТ (мРНК ПЖТ/ВЖТ ≤ 0.5 , или относительный уровень мРНК в ПЖТ ниже относительного уровня мРНК в ВЖТ как минимум на 50%) — последнюю использовали в качестве референсной категории. Показано снижение шансов развития МС у лиц, у которых экспрессия гена *ABCG1* в ПЖТ была выше, чем у лиц с повышенной экспрессией данного гена в ВЖТ: OR (K1 vs K3) = 0.08 (95% ДИ 0.01–0.81), p = 0.033. В случае категорий К2 и K3 различий не найдено, поэтому при последующем анализе они были объединены (K0). Таким образом, более высокая экспрессия гена *ABCG1* в ПЖТ, чем в ВЖТ ассоциирована со снижением

		Женщины без МС (Группа сравнения)					
_	Женшины с-МС		из них:				
Показатель	N = 36	без MC N = 26	абдоминальное ожирение без MC, <i>N</i> = 13	без избыточного веса, N = 13			
Возраст, лет	53.41 ± 9.84§ 54 (30–68)	42.50 ± 12.49 38 (28-73)	46.15 ± 12.10† 48 (28–64)	38.18 ± 12.05 36 (30-73)			
Менопауза, N (%)	17 (47%)	5 (19%)	4 (31%)	1 (7%)			
Курение, N (%)	10 (28%)	8 (32%)	6 (46%)	2 (15%)			
Окружность талии, см	100.72 ± 15.05§ 97 (86–160)	82.33 ± 14.34 83 (58–107)	93.46 ± 7.90‡ 94 (81–107)	69.18 ± 6.82 70 (58-80)			
Индекс массы тела*, кг/м ²	32.10 ± 7.62§ 30.6 (23.5-61.7)	24.49 ± 4.78 23.6 (17.4–32.3)	27.85 ± 3.56‡ 28.7 (20.6–32.3)	20.52 ± 2.32 21.0 (17.4–25.0)			
Глюкоза, ммоль/л	5.71 ± 0.60 §	4.91 ± 0.35	5.01 ± 0.35	4.81 ± 0.32			
Инсулин, мкЕд./мл	9.06 ± 6.01 7.75 (1.10–24.3)§	4.92 ± 3.78 3.90 (1.00–18.50)	5.83 ± 4.85 5.20 (1.00–18.50)	3.93 ± 1.83 3.15 (1.40-6.5)			
Индекс инсулинорезистентности HOMA-IR*	2.35 ± 1.64 1.87 (0.28-6.11)¥	$\begin{array}{c} 1.12 \pm 0.86 \\ 0.81 \ (0.23 - 3.84) \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.38 \pm 1.07 \\ 1.19 \; (0.23 {-} 3.84) \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.83 \pm 0.43 \\ 0.68 \ (0.27 - 1.43) \end{array}$			
Общий холестерин, ммоль/л	$5.54 \pm 1.55 ¥$	4.76 ± 0.95	$5.25 \pm 0.88 \dagger$	4.19 ± 0.70			
Холестерин в составе ЛПВП, ммоль/л	$1.11\pm0.30~{\rm ¥}$	1.43 ± 0.30	1.43 ± 0.28	1.43 ± 0.34			
Холестерин в составе ЛПНП, ммоль/л	3.43 ± 1.37	2.84 ± 0.76	$3.24 \pm 0.67 \ddagger$	2.31 ± 0.54			
Триглицериды, ммоль/л	2.14 ± 1.00 §	1.18 ± 0.42	1.24 ± 0.39	1.09 ± 0.46			
Коэффициент атерогенности*	3.40 ± 1.60 §	2.43 ± 0.80	2.74 ±0 .55†	2.02 ± 0.92			

Таблица 2. Антропометрические и лабораторные показатели у женщин с метаболическим синдромом и без этой патологии

Примечание: указаны средние значения \pm SD, дополнительно может быть указана медиана (мин.—макс.). * Рассчитаны по следующим формулам: Индекс массы тела (кг/м²) = масса тела (кг) / (рост, (м))². Индекс инсулинорезистентности HOMA-IR = Глюкоза натощак (ммоль/л) × инсулин натощак (мкЕд./мл) /22.5. Коэффициент атерогенности = (Общий холестерин (ммоль/л) – ХС-ЛПВП (ммоль/л)) / ХС-ЛПВП (ммоль/л). ¥ p < 0.05 при сравнении группы с МС и общей выборки без МС. § p < 0.001 при сравнении группы с МС и общей выборки без МС. † p < 0.05 при сравнении подгруппы с абдоминальным ожирением без МС и подгруппы без избыточного веса. $\ddagger p < 0.001$ при сравнении подгруппы с абдоминальным ожирением без МС и подгруппы без избыточного веса. Условные обозначения: ЛПВП – липопротеины высокой плотности, ЛПНП – липопротеины низкой плотности.

шансов развития МС по сравнению с обратной ситуацией, т.е. когда экспрессия данного гена в ВЖТ была выше или сравнима с ПЖТ: OR (K1 vs K0) = = 0.15 (95% ДИ 0.03-0.76), *р* = 0.023. У лиц с повышенной экспрессией гена ABCG1 в ПЖТ меньше окружность талии и индекс массы тела. которые традиционно используются для оценки степени ожирения ($R^2 = 0.144$, $\beta = -0.405$, p = 0.006 и $R^2 =$ $= 0.191, \beta = -0.459, p = 0.004$ соответственно), ниже концентрация инсулина ($R^2 = 0.094, \beta = -0.339, p =$ = 0.025) и триглицеридов ($R^2 = 0.216, \beta = -0.485,$ p = 0.001) в плазме крови, а также коэффициент атерогенности ($R^2 = 0.123$, $\beta = -0.381$, p = 0.014). У них снижена вероятность развития артериальной гипертензии (р = 0.005; коррекция по возрасту OR (K1 vs K0) = 0.17 (95% ДИ 0.03-0.96), p = 0.044). При этом соотношение мРНК ABCG1 ПЖТ/ВЖТ

отрицательно коррелировало с возрастом (r = -0.397, p = 0.006). Анализ экспрессии гена *ABCA1* с использованием аналогичного подхода показал, что лица с более высокой экспрессией гена *ABCA1* в ПЖТ, чем в ВЖТ, имеют более высокий уровень ХС-ЛПВП плазмы крови ($R^2 = 0.104$, $\beta = 0.364$, p = 0.037). Данный подход некорректен и не применялся к анализу генов *PPARG* и *LXR* β , так как их экспрессия в ПЖТ выше, чем в ВЖТ, и гена *RORA*, экспрессия которого одинакова в ПЖТ и ВЖТ.

Проанализирована связь уровня экспрессии, а также соотношения мРНК ПЖТ/ВЖТ всех исследуемых генов с антропометрическими и биохимическими характеристиками женщин, а также в зависимости от фактора курения. Выявлено существование взаимосвязей между изучаемыми параметрами, выбраны предполагаемые незави-

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТРАНСПОРТЕРОВ АВСА1 И АВСС1

		Лица без МС (Группа сравнения)					
Ген.	Женшины с МС		из них:				
уровень мРНК	N = 36	без MC N = 26	абдоминальное ожирение без МС <i>N</i> = 13	без избыточного веса и ожирения N = 13			
ABCA1							
ПЖТ ВЖТ ПЖТ/ВЖТ	1.69 (0.68–8.70) 1.77 (0.79–7.79) 0.91 (0.34–5.63)	2.62 (0.25–9.99) 1.38 (0.55–8.37) 1.45 (0.27–4.33)	2.11 (0.81–9.99) 1.33 (0.56–8.37) 1.34 (0.27–3.71)	2.72 (0.25–7.16) 1.93 (0.55–8.25) 1.73 (0.37–4.33)			
ABCG1							
ПЖТ ВЖТ ПЖТ/ВЖТ	3.37 (0.44–10.10)* 4.55 (1.49–21.07) 0.88 (0.05–2.56) *	5.35 (0.90–13.32) 3.07 (1.33–12.33) 1.79 (0.56–6.27)	5.89 (0.9–13.32) 3.53 (1.33–7.13) 1.55 (0.56–6.27)	5.10 (1.48–12.15) 2.66 (1.57–12.33) 1.87 (0.67–4.12)			
RORA							
ПЖТ ВЖТ ПЖТ/ВЖТ	0.86 (0.39–3.12) 0.91 (0.42–2.36) 0.81 (0.41–2.05)	1.08 (0.23–13.53) 0.91 (0.38–18.27) 1.04 (0.65–2.09)	1.15 (0.66–1.83) 0.97 (0.38–1.87) 1.01 (0.72–2.09)	0.92 (0.23–13.53) 0.83 (0.77–18.27) 1.06 (0.65–2.05)			
$LXR\beta$ (NR1H2)							
ПЖТ ВЖТ ПЖТ/ВЖТ	1.60 (0.55–3.35) 1.28 (0.23–5.15) 1.33 (0.31–3.64)	1.46 (0.32–2.90) 1.02 (0.42–3.66) 1.53 (0.44–2.85)	1.23 (0.5–2.61) 0.71 (0.46–3.66) 1.83 (0.44–2.85)	1.56 (0.32–2.90) 1.13 (0.42–1.76) 1.40 (0.95–2.05)			
PPARG							
ПЖТ ВЖТ ПЖТ/ВЖТ	0.97 (0.65–1.46)§ 0.68 (0.14–1.18) 1.39 (0.74–2.64)	1.24 (0.31–1.95) 0.42 (0.10–1.50) 1.83 (1.29–2.57)	0.69 (0.31–1.08) 0.36 (0.24–0.42) 1.94 (1.29–2.57)	1.53 (1.22–1.95) 0.68 (0.10–1.50) 1.83 (1.65–2.01)			

Таблица 3. Уровень мРНК генов ABCA1, ABCG1, RORA, LXR^β (NR1H2), PPARG в исследуемых группах

*p = 0.017 U – критерий Манна–Уитни при сравнении с группой без MC. Различия статистически незначимы после коррекции по возрасту: p = 0.003 при сравнении с группой без MC. Коррекция по возрасту: при представлении данных по соотношению мРНК ПЖТ/ВЖТ в качестве трехуровневой категориальной переменной (уровень мРНК выше в ВЖТ относительно ПЖТ – в качестве референсной подгруппы): OR(K1 vs K3) = 0.08 (95% ДИ 0.01–0.81), p = 0.033; K2 vs K3 – p = 0.727; в качестве двухуровневой категориальной переменной (уловень мРНК выше в ВЖТ относительно ПЖТ – в качестве референсной подгруппы): OR(K1 vs K3) = 0.08 (95% ДИ 0.03–0.76), p = 0.023. § p = 0.009 H-критерий Краскела–Уоллеса при сравнении трех выборок (MC; абдоминальное ожирение без MC; без MC и ожирения); уровень значимости с поправкой на множественные сравнения методом Данна: p = 0.009 при сравнении группой без избыточного веса и ожирением, p = 0.006 при сравнении подгруппы с ожирением без MC с подгруппой без избыточного веса и ожирения, p = 0.899 при сравнении лиц с ожирением в зависимости от MC. Различия статистически незначимы после коррекции по возрасту.

симые факторы, одновременное влияние которых на уровень экспрессии исследуемых генов в жировой ткани проанализировано далее методом множественного регрессионного анализа.

В частности, анализ зависимости экспрессии генов от курения показал, что уровень мРНК гена *ABCA1* снижен в ПЖТ курящих женщин (p == 0.001). Не выявлено влияния курения на уровень экспрессии других генов в жировой ткани. Таким образом, курение может рассматриваться как один из независимых предикторов уровня экспрессии гена *ABCA1*. Наблюдалась положительная корреляция между соотношением мРНК ABCA1 ПЖТ/ВЖТ и уровнем ХС-ЛПВП. Снижение уровня ХС-ЛПВП рассматривается как один из компонентов МС и как проявление атерогенной дислипидемии, при которой, как правило, наблюдается повышение уровня общего ХС плазмы крови. Поэтому при построении регрессионных моделей для гена АВСА1 в качестве независимых предикторов учитывали уровень общего ХС и ХС-ЛПВП плазмы крови, курение и возраст (табл. 4). Множественный регрессионный анализ показал, что курение ассоциировано со снижением экспрессии гена ABCA1 не только в ПЖТ, но и в ВЖТ. Однако, как видно из табл. 4, экспрессия гена *АВСА1* в ВЖТ может понижаться с возрастом, но увеличиваться при атерогенной дислипидемии (общий ХС плазмы крови выступает как фактор, повышающий уровень мРНК гена АВСА1 в ВЖТ, а уровень ХС-ЛПВП – как понижающий). Таким образом, с помощью множественного регрессионного анализа выявлена взаимосвязь уровня мРНК гена *ABCA1* в ВЖТ с уровнем общего ХС и ХС-ЛПВП плазмы крови, курением и возрастом. Такую взаимосвязь невозможно установить путем простого корреляционного анализа.

Нами выявлено, что уровень мРНК гена **PPARG** в ПЖТ отрицательно коррелирует с индексом массы тела (r = -0.780, p = 0.000; после коррекции по возрасту $R^2 = 0.331$, $\beta = -0.602$, p = 0.003), а также с окружностью талии (r = -0.573, p = 0.005; после коррекции по возрасту $R^2 = 0.384$, $\beta = -0.642$. p = 0.001) в общей выборке. Обнаружены отрицательные корреляции соотношения мРНК LXRβ и РРАКС ПЖТ/ВЖТ с уровнем инсулина плазмы крови (после коррекции по возрасту $R^2 = 0.101$, $\beta = -0.355, p = 0.031 \text{ M} R^2 = 0.476, \beta = -0.819, p =$ = 0.004 соответственно) и индексом инсулинорезистентности HOMA-IR (после коррекции по возрасту $R^2 = 0.198$, $\beta = -0.534$, p = 0.014 и $R^2 = 0.628$, $\beta = -1.053, p = 0.008$ соответственно). Следует учитывать, что соотношение мPHK PPARG ПЖТ/ВЖТ выступает как независимый предиктор величины соотношения мРНК LXRβ ПЖТ/ВЖТ с учетом коррекции по возрасту и уровню инсулина плазмы крови ($R^2 = 0.471$, $\beta = 0.715$, p = 0.004). Поэтому значимой, по-видимому, может быть лишь одна из выявленных взаимосвязей. Таким образом, при построении регрессионных моделей для гена *PPARG* в качестве независимых предикторов могут быть рассмотрены окружность талии (или индекс массы тела) как маркер избыточного веса и ожирения, а также параметры, отражающие развитие инсулинорезистентности. Однако ни для гена PPARG, ни для других генов, кроме ABCA1, не выявлены регрессионные модели, устанавливающие одновременное влияние на экспрессию гена двух и более факторов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании нами показано, что соотношение экспрессии генов ABCA1 и ABCG1 в ПЖТ и ВЖТ может быть значимым прогностическим фактором развития атерогенной дислипидемии и МС при ожирении. Ранее показано возрастное увеличение частоты МС у жителей города Санкт-Петербурга с максимальными значениями в самой старшей возрастной группе [28, 30]. В частности, у лиц среднего (45–55 лет) возраста МС диагностируется в 2.5 раза чаще, чем у молодых (до 44 лет) [30]. Женщины с абдоминальным ожирением без метаболических нарушений, как правило, моложе, чем пациентки с МС [30]. Нами показано, что возраст, абдоминальное ожирение и развитие МС ассоциированы со снижением соотношения мРНК гена ABCG1 ПЖТ/ВЖТ. Несмотря на то, что этот результат может быть возрастной особенностью, связанной с гормональной перестройкой у женщин в менопаузе, нельзя исключать, что нарушение обмена ХС в жировой ткани обусловливает дисфункцию жировой ткани и повышенный риск развития МС именно в старшей возрастной группе.

Старение оказывает существенное влияние на способность к накоплению липидов и распределение жировой ткани, процентное содержание которой увеличивается с возрастом, главным образом, за счет ВЖТ [31]. У женщин в пременопаузе жировая ткань распределяется преимущественно в подкожном отделе, что связано с высокой экспрессией альфа-рецептора эстрогена в ПЖТ [31]. После достижения менопаузы уровень эстрогенов у женщин снижается, а соотношение андрогенов и эстрогенов увеличивается, при этом происходит перераспределение липидов в ВЖТ, что сопровождается повышенным риском MC, сахарного диабета и сердечно-сосудистых заболеваний [31].

	Параметр модели		Независимый предиктор					
Ген АВСА1			возраст	курение	холестерин ЛПВП	общий холестерин		
Уровень мРНК в ПЖТ	$R^2 = 0.144$ F = 6.883 p = 0.013	β	0.031	-0.410	0.080	-0.062		
		р	0.851	0.013	0.614	0.703		
Уровень мРНК в ВЖТ	$R^2 = 0.315$ F = 4.556 p = 0.006	β	-0.749	-0.492	-0.333	0.545		
		р	0.002	0.006	0.042	0.022		
Соотношение мРНК	$R^{2} = 0.200$ F = 8.497 p = 0.007	β	-0.237	-0.263	0.476	-0.304		
		р	0.149	0.109	0.007	0.069		

Таблица 4. Пример регрессионного анализа. Оценка влияния независимых предикторов на уровень экспрессии гена *АВСА1* в ПЖТ и ВЖТ

Так женщины, у которых экспрессия гена ABCG1 была выше в ПЖТ, отличались по компонентам MC от женщин с сопоставимым или более низким уровнем экспрессии гена ABCG1 в ПЖТ, чем в ВЖТ. Таким образом, после менопаузы экспрессия гена ABCG1 в ПЖТ может снижаться с возрастом, а в ВЖТ, наоборот, возрастать, коррелируя при этом с развитием MC. Однако, как показано нами ранее, увеличение уровня мРНК гена ABCG1 в ВЖТ мужчин и женщин при ожирении не сопровождается повышением уровня соответствующего белка в адипоцитах [22]. Аналогичный результат получен позже в работе Choromanska и соавт. [32].

Жировая ткань, как показано ранее, может влиять на уровень ЛПВП плазмы крови, поскольку в ней, по данным некоторых исследователей, синтезируется до 15% ЛПВП [8, 11]. Так, у мышей с нокаутом гена *Abca1* в адипоцитах снижается уровень общего ХС и ХС-ЛПВП в плазме крови [11]. Нами показано, что у лиц с повышенным содержанием мРНК гена *ABCA1* в ПЖТ по сравнению с ВЖТ выше уровень ХС-ЛПВП в плазме крови, что подчеркивает атеропротективную роль ABCA1 в ПЖТ.

В исследовании Vincent и соавт. показано снижение экспрессии гена (мРНК и белок) АВСА1 в ВЖТ при ожирении, в то время как в ПЖТ отсутствовали статистически значимые различия [33]. Следует заметить, что нами выявлено снижение мРНК АВСА1 в ПЖТ при наличии фактора курения. Действительно, ранее другие авторы показали, что курение ассоциировано со снижением экспрессии гена ABCA1 в макрофагах [34]. Однако Vincent и соавт. этот фактор не учитывали [33], при этом отсутствовали указания на гендерный состав выборки, а пациенты имели вторую и третью степень ожирения, тогда как в нашей выборке преобладали женщины с первой и второй степенью ожирения, что может объяснять различия в полученных результатах.

Paнee Tavoosi и соавт. обнаружили снижение уровня мРНК гена *АВССІ* в моноцитах крови при МС [35], что согласуется с данными о повышении уровня метилирования регуляторного участка гена *ABCG1* (cg06500161) в клетках крови при MC [36]. Снижение уровня мРНК гена ABCG1 в мононуклеарах крови отмечено также при атеросклерозе [37]. Так показано, что у пациентов с МС отток ХС из клеток на ЛПВП снижен по сравнению с лицами без МС [38]. Можно предположить, что снижение экспрессии транспортеров в ПЖТ может быть фактором, обусловливающим риск развития атеросклероза и сердечно-сосудистых осложнений при МС. И хотя повышение уровня мРНК гена ABCG1 в ВЖТ при ожирении отмечено в нескольких работах, результаты других исследований однозначно свидетельствуют о снижении

уровня белков ABCA1 и ABCG1 в жировой ткани при ожирении и MC [9, 22, 32, 33].

Интересно, что у мышей со специфическим нокаутом генов Abca1 или Abcg1 в адипоцитах наблюдается снижение экспрессии гена Pparg в жировой ткани, связанное, по всей видимости, с накоплением ХС в адипоцитах [9, 11]. Методом РНК-интерференции показано также. что снижение экспрессии гена АВСА1 в культуре преадипоцитов 3T3L1 коррелирует со снижением экспрессии гена PPARG [11]. Однако снижение экспрессии гена PPARG может еще больше угнетать экспрессию генов АВСА1 и АВССЯ. Учитывая различия в возрасте женшин в выборке, следует отметить, что возраст не влияет на уровень экспрессии гена PPARG, однако с возрастом увеличивается фосфорилирование его продукта по Ser273, которое может потенциально влиять на аффинность к кофакторам и запуск программ транскрипции различных генов [39]. Таким образом, при старении может происходить нарушение ОТХ вследствие дисрегуляции транскрипционного каскада PPARG/LXRs/ABCA1/ABCG1.

В нашей работе показано, что уровень мРНК гена *PPARG* в ПЖТ отрицательно коррелирует с индексом массы тела и с окружностью талии. Ранее было выявлено снижение экспрессии гена *PPARG* в ПЖТ у лиц с ожирением, более выраженное у больных сахарным диабетом второго типа по сравнению с пациентами без диабета [22, 40, 41]. Следует отметить, что, согласно нашим данным и данным других исследователей, уровень экспрессии гена *PPARG* в ПЖТ выше, чем в ВЖТ [42, 43]. У модельных животных активация РРАКу приводит к перераспределению жировой массы из ВЖТ в ПЖТ, ассоциированному со снижением уровня циркулирующего инсулина [44]. Выявленная нами отрицательная корреляция соотношения мPHK PPARG ПЖТ/ВЖТ с уровнем инсулина плазмы крови и индекса инсулинорезистентности HOMA-IR свидетельствует о том, что снижение этого показателя может быть связано с меньшей чувствительностью тканей к инсулину и развитием инсулинорезистентности. PPARу регулирует адипогенез, запасание и метаболизм липидов в жировой ткани [45]. Нарушение функций РРАРу при инсулинорезистентности может усиливать воздействие липидов на другие ткани: избыточный приток жирных кислот приводит к увеличению содержания внутриклеточных липилов в печени и мышцах, которое сопровожлается компенсаторной гиперсекрецией инсулина [45]. Селективные активаторы РРАРу (тиазолидиндионы), применяемые при сахарном диабете типа 2, снижают уровень гипергликемии и гиперинсулинемии у пациентов [17]. Можно предположить, что увеличенная экспрессия гена *PPARG* в ПЖТ обеспечивает энергетический баланс между ПЖТ

и ВЖТ и предотвращает нарушение обмена липидов и глюкозы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе показано, что соотношение экспрессии генов ABCA1, ABCG1 и PPARG в жировой ткани разного типа (ПЖТ/ВЖТ) можно рассматривать как значимый прогностический фактор развития атерогенной дислипидемии, МС, инсулинорезистентности при ожирении. Женшины, v которых vровень мРНК гена *АВССІ* в ПЖТ выше, чем в ВЖТ, имеют меньшую окружность талии и индекс массы тела, а также концентрацию триглицеридов и инсулина в плазме крови, у них снижен риск артериальной гипертензии и, как следствие, МС. Лица, у которых содержание мРНК гена АВСА1 в ПЖТ повышено относительно ВЖТ, имеют более высокий уровень ХС-ЛПВП в плазме крови, что подчеркивает атеропротективную роль АВСА1 в ПЖТ. Показана ассоциация фактора курения со снижением экспрессии гена АВСА1 в жировой ткани. Снижение соотношения мРНК гена PPARG ПЖТ/ВЖТ ассоциировано с увеличением уровня инсулина в плазме крови и HOMA-IR.

Благодарим сотрудников кафедры общей хирургии с клиникой и клинику акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова за помощь в подготовке биоматериала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекта № 20-015-00502).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Проведение работы одобрено локальным этическим комитетом ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Tchernof A., Despres J.P. (2013) Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol. Rev.* **93**(1), 359–404.
- Despres J.P., Lemieux I. (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 444(7121), 881–887.
- 3. Engin A. (2017) The pathogenesis of obesity-associated adipose tissue inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **960**, 221–245.
- 4. Yu B.L., Zhao S.P., Hu J.R. (2010) Cholesterol imbalance in adipocytes: a possible mechanism of adipocytes dysfunction in obesity. *Obes. Rev.* **11**, 560–567.

- Le Lay S., Ferre P., Dugail I. (2004) Adipocyte cholesterol balance in obesity. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 103– 106.
- Aguilar D., Luz Fernandez M. (2014) Hypercholesterolemia induces adipose dysfunction in conditions of obesity and nonobesity. *Adv. Nutr.* 5(5), 497–502.
- la Rose A.M, Bazioti V., Westerterp M. (2018) Adipocyte membrane cholesterol regulates obesity. *Arterio*scler. Thromb. Vasc. Biol. 38, 687–689.
- Chung S., Sawyer J.K., Gebre A.K., Maeda N., Parks J.S. (2011) Adipose tissue ATP binding cassette transporter A1 contributes to high-density lipoprotein biogenesis *in vivo. Circulation.* **124**, 1663–1672.
- Frisdal E., Le Lay S., Hooton H., Poupel L., Olivier M., Alili R., Plengpanich W., Villard E.F., Gilibert S., Lhomme M., Superville A., Miftah-Alkhair L., Chapman M.J., Dallinga-Thie, Venteclef N., Poitou C., Tordjman J., Lesnik P., Kontush A., Huby T., Dugail I., Clement K., Guerin M. (2015) Adipocyte ATP-binding cassette G1 promotes triglyceride storage, fat mass growth, and human obesity. *Diabetes*. 64(3), 840–855.
- Демина Е.П., Мирошникова В.В., Шварцман А.Л. (2016) Роль АВС транспортеров А1 и G1 – ключевых белков обратного транспорта холестерина в развитии атеросклероза. *Молекуляр. биология*. 50(2), 223–230.
- Cuffe H., Liu M., Key C.C., Boudyguina E., Sawyer J.K., Weckerle A., Bashore A., Fried S.K., Chung S., Parks J.S. (2018) Targeted deletion of adipocyte ABCA1 (ATPbinding cassette transporter A1) impairs diet-induced obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38(4), 733– 743.
- 12. de Haan W., Bhattacharjee A., Ruddle P., Kang M.H., Hayden M.R. (2014) ABCA1 in adipocytes regulates adipose tissue lipid content, glucose tolerance, and insulin sensitivity. *J. Lipid Res.* **55**(3), 516–523.
- Murphy A.J., Yvan-Charvet L. (2015) Adipose modulation of ABCG1 uncovers an intimate link between sphingomyelin and triglyceride storage. *Diabetes.* 64, 689–692.
- 14. Hardy L.M., Frisdal E., Le Goff W. (2017) Critical role of the human ATP-binding cassette G1 transporter in cardiometabolic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **18(9)**, 1892.
- 15. Kim K., Boo K., Yu Y.S., Oh S.K., Kim H., Jeon Y., Bhin J., Hwang D., Kim K.I., Lee J.S., Im S.S., Yoon S.G., Kim I.Y., Seong J.K., Lee H., Fang S., Baek S.H. (2017) RORα controls hepatic lipid homeostasis via negative regulation of PPARγ transcriptional network. *Nat. Commun.* 8, 162.
- Laurencikiene J., Rydén M. (2012) Liver X receptors and fat cell metabolism. *Int. J. Obesity.* 36, 1494–1502.
- Grygiel-Górniak B. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications. *Nutr. J.* 14, 13–17.
- Xu P., Zhai Y., Wang J. (2018) The role of PPAR and its cross-talk with CAR and LXR in obesity and atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 19(4), 1260.
- 19. Kidani Y., Bensinger S.J. (2012) LXR and PPAR as integrators of lipid homeostasis and immunity. *Immunol. Rev.* **249**(1), 72–83.
- 20. Jetten A.M., Kang H.S, Takeda Y. (2013) Retinoic acid-related orphan receptors α and γ : key regulators of

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021
lipid/glucose metabolism, inflammation, and insulin sensitivity. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **4**, 1.

- Matsuoka H., Tokunaga R., Katayama M., Hosoda Y., Miya K., Sumi K., Ohishi A., Kamishikiryo J., Shima A., Michihara A. (2020) Retinoic acid receptor-related orphan receptor α reduces lipid droplets by upregulating neutral cholesterol ester hydrolase 1 in macrophages. *BMC Mol. Cell. Biol.* 21, 32.
- 22. Мирошникова В.В., Пантелеева А.А., Баженова Е.А., Демина Е.П., Усенко Т.С., Николаев М.А., Семенова И.А., Неймарк А.Е., Хе Чж., Беляева О.Д., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н. (2016) Регуляция экспрессии генов транспортеров АВ-СА1 и ABCG1 в интраабдоминальной жировой ткани. Биомед. химия. 62(3), 283–289.
- Porter S.A., Massaro J.M., Hoffmann U., Vasan R.S., O'Donnel C.J. (2009) Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot. *Diabetes Care.* 32(6), 1068–1075.
- Narumia H., Yoshidab K., Hashimotoc N., Umeharab I., Funabashia N., Yoshidab S., Komuroa I. (2009) Increased subcutaneous fat accumulation has a protective role against subclinical atherosclerosis in asymptomatic subjects undergoing general health screening. *Internat. J. Cardiol.* 135(2), 150–155.
- Ladeiras-Lopes R., Sampaio F., Bettencourt N., Fontes-Carvalho R., Ferreira N., Leite-Moreira A., Gama V. (2017) The ratio between visceral and subcutaneous abdominal fat assessed by computed tomography is an independent predictor of mortality and cardiac events. *Rev. Esp. Cardiol.* **70**(5), 331–337.
- Oh Y.H., Moon J.H., Kim H.J., Kong M.H. (2017) Visceral-to-subcutaneous fat ratio as a predictor of the multiple metabolic risk factors for subjects with normal waist circumference in Korea. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 10, 505–511.
- 27. Alberti K.G., Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z., Cleeman J.I., Donato K.A., Fruchart J.C., James W.P., Loria C.M., Smith S.C. International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; Hational Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; World Heart Federation; Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 120(16), 1640–1645.
- Ротарь О.П., Либис Р.А., Исаева Е.Н., Ерина А.М., Шавшин Д.А., Могучая Е.В., Колесова Е.П., Бояринова М.А., Морошкина Н.В., Яковлева О.И., Солнцев В.Н., Конради А.О., Шляхто Е.В. (2012) Распространенность метаболического синдрома в разных городах РФ. *Росс. кардиол. ж.* 2, 55–62.
- Mogilenko D.A., Shavva V.S., Dizhe E.B., Orlov S.V., Perevozchikov A.P. (2010) PPARγ activates ABCA1 gene transcription but reduces the level of ABCA1 protein in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 477–482.

- 30. Бровин Д.Л., Драчева К.В., Пантелеева А.А., Беляева О.Д., Баженова Е.А., Каронова Т.Л., Колодина Д.А., Полякова Е.А., Волкова А.Р., Козлова С.Н., Беркович О.А., Пчелина С.Н., Баранова Е.И. (2019) Варианты гена адипонектина (ADIPOQ) rs2241766 и rs266729: ассоциация с концентрацией общего и высокомолекулярного адипонектина сыворотки крови у женщин с абдоминальным ожирением и метаболическим синдромом. *Мед. генетика.* 18(1), 25–34.
- 31. Mancuso P., Bouchard B. (2019) The impact of aging on adipose function and adipokine synthesis. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **11**(10), 137.
- Choromanska B., Mysliwiec P., Hady H.R., Dadan J., Mysliwiec H., Bonda T., Chabowski A., Miklosz A. (2019) The implication of adipocyte ATP-binding cassette A1 and G1 transporters in metabolic complications of obesity. *J. Physiol. Pharmacol.* **70**(1), 143–152.
- 33. Vincent V., Thakkar H., Aggarwal S., Mridha AS., Ramakrishnan L., Singh A. (2019) ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression in adipose tissue and its modulation with insulin resistance in obesity diabetes, metabolic syndrome and obesity. *Targets Therapy.* 12, 275–284.
- 34. Song W., Wang W., Dou L.Y., Wang Y., Xu Y., Chen L.F., Yan X.W. (2015) The implication of cigarette smoking and cessation on macrophage cholesterol efflux in coronary artery disease patients. *J. Lipid Res.* 56(3), 682– 691.
- 35. Tavoosi Z., Moradi-Sardareh H., Saidijam M., Yadegarazari R., Borzuei S., Soltanian A., Goodarzi M.T. (2015) Cholesterol transporters *ABCA1* and *ABCG1* gene expression in peripheral blood mononuclear cells in patients with metabolic syndrome. *Cholesterol.* 2015, 682904.
- Akinyemiju T., Do A.N., Patki A., Aslibekyan S., Zhi D., Hidalgo B., Tiwari H.K., Absher D., Geng X., Arnett D.K., Irvin M.R. (2018). Epigenome-wide association study of metabolic syndrome in African-American adults. *Clin. Epigenet.* 10, 49.
- 37. Мирошникова В.В., Демина Е.П., Майоров Н.В., Давыденко В.В., Курьянов П.С., Вавилов В.Н., Виноградов В.Г., Денисенко А.Д., Шварцман А.Л. (2014) Особенности экспрессии гена транспортера ABCG1 в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с атеросклерозом. Цитология. 56(3), 234–240.
- Borja M.S., Hammerson B., Tang C., Savinova O.V., Shearer G.C., Oda M.N. (2017) Apolipoprotein A-I exchange is impaired in metabolic syndrome patients asymptomatic for diabetes and cardiovascular disease. *PLoS One*. **12**(8), e0182217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182217
- Ma X., Wang D., Zhao W., Xu L. (2018) Deciphering the roles of PPAR γ in adipocytes via dynamic change of transcription complex. *Front. Endocrinol.* 9, 473.
- Leyvraz C., Verdumo C., Suter M., Paroz A., Calmes J.-M., Marques-Vidal P.M., Giusti V. (2012) Changes in gene expression profile in human subcutaneous adipose tissue during significant weight loss. *Obes. Facts.* 5, 440– 445.
- 41. Dubois S.G., Heilbronn L.K., Smith S.R., Albu J.B., Kelley D.E., Ravussin E. (2006) Decreased expression

of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes. *Obesity*. **14**, 1543–1552.

- 42. Giusti V., Verdumo C., Suter M., Gaillard R.C., Burckhardt P., Pralong F. (2003) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women. *Diabetes.* 52, 1673–1676.
- Hammes T.O., Costa Cdos S., Rohden F., Margis R., de Almeida J.C., Padoin A.V., Mottin C.C., Guaragna R.M. (2012) Parallel down-regulation of FOXO1, PPARγ and adiponectin mRNA expression in visceral adipose tis-

sue of class III obese individuals. Obes. Facts. 5(3), 452-459.

- 44. Laplante M., Festuccia W.T., Soucy G., Gelinas Y., Lalonde J., Berger J.P., Deshaies Y. (2006) Mechanisms of the depot specificity of peroxisome proliferator-activated receptor action on adipose tissue metabolism. *Diabetes*. **55**(10), 2771–2778.
- Sugden M.C., Holness M.J. (2008) Role of nuclear receptors in the modulation of insulin secretion in lipid-induced insulin resistance. *Biochem. Soc. Transact.* 36(5), 891–900.

EXPRESSION OF GENES ENCODING TRANSPORTERS ABCA1 AND ABCG1 AND TRANSCRIPTIONAL FACTORS PPARγ, LXRβ AND RORα IN SUBCUTANEOUS AND VISCERAL ADIPOSE TISSUE IN WOMEN WITH METABOLIC SYNDROME

A. A. Panteleeva^{1, 2}, N. D. Razgildina¹, D. L. Brovin², I. A. Pobozheva^{1, 2}, K. V. Dracheva¹, O. A. Berkovich², E. A. Polyakova², O. D. Belyaeva², E. I. Baranova², S. N. Pchelina^{1, 2}, and V. V. Miroshnikova^{1, 2}, *

¹Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, 188300 Russia

²Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St.-Petersburg, 197022 Russia *e-mail: v.v.mirosh@gmail.com

The study was aimed to investigate tissue-specific gene expression of ABCA1 and ABCG1, encoding cholesterol transporters, as well as PPARG, $LXR\beta$ (NR1H2) and RORA, encoding the most important transcriptional regulators of lipid metabolism, in subcutaneous and visceral adipose tissue (SAT and VAT) in women with metabolic syndrome. It was shown that the ABCG1 mRNA SAT/VAT ratio decreases with age and correlates with the development of metabolic syndrome. After age adjustment, women have reduced chances of metabolic syndrome development when ABCG1 gene expression in SAT is higher relative to VAT compared to women with VAT *ABCG1* gene expression higher or comparable to SAT: OR = 0.15 (95% CI 0.03–0.76), p =0.023. The ABCA1 mRNA SAT/VAT ratio was positively correlated with HDL cholesterol levels, therefore individuals with higher ABCA1 mRNA level in SAT relative to VAT had elevated HDL levels. The ABCA1 mRNA level in SAT was decreased in smokers (p = 0.001). There was a negative correlation between the *PPARG* mRNA level in SAT with body mass index and waist circumference in the general sample ($\beta = -0.602$, p = 0.003 and $\beta = -0.642$, p = 0.001, respectively, after age adjustment). A decrease of the *PPARG* mRNA SAT/VAT ratio was associated with elevated plasma insulin level and insulin resistance index HOMA-IR ($\beta = -0.819$, p = 0.004and $\beta = -1.053$, p = 0.008, respectively, after age adjustment). Thus, the study have shown that the ratio of ABCA1, ABCG1, and PPARG gene's expression in different types of adipose tissue (SAT/VAT) could be a significant factor that predicts the development of atherogenic dyslipidemia, metabolic syndrome and insulin resistance during obesity.

Keywords: obesity, metabolic syndrome, cholesterol transporters ABCA1 and ABCG1, PPARy

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.852:577.152.3

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *LAC4* У МОЛОЧНЫХ И ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ *Kluyveromyces*

© 2021 г. Л. В. Лютова^{а, b}, Г. И. Наумов^а, А. В. Шнырева^b, Е. С. Наумова^{а, *}

^аГосударственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Москва, 117545 Россия ^bБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: lena_naumova@yahoo.com Поступила в редакцию 17.06.2020 г. После доработки 28.07.2020 г. Принята к публикации 04.08.2020 г.

Характерной особенностью молочных дрожжей Kluyveromyces lactis является способность ферментировать лактозу, тогда как подавляющее большинство остальных видов дрожжей не способны даже ассимилировать этот дисахарид. Молекулярный полиморфизм генов LAC4, кодирующих β-галактозидазу, контролирующую ферментацию лактозы, практически не изучен, а опубликованные данные касаются только одного штамма K. lactis var. lactis – NRRL Y-1140, выделенного из сливок в США. С помощью молекулярного кариотипирования, Саузерн-гибридизации и секвенирования мы изучили гены β-галактозидазы v сбраживающих лактозу штаммов K. lactis. выделенных из молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира. Установлено, что у молочных дрожжей K. lactis var. lactis способность ферментировать лактозу контролируется по крайней мере тремя полимерными локусами LAC различной хромосомной локализации: LAC1 (хромосома III), LAC2 (II) и LAC3 (IV). Большинство изученных нами штаммов обладали локусом LAC2. Впервые проведен сравнительный анализ β-галактозидаз дрожжей рода *Kluyveromyces* и этих ферментов из других дрожжей. Филогенетический анализ выявил значительные различия между белками LAC4 дрожжей рода Kluyveromyces (K. lactis, K. marxianus, K. aestuarii, K. nonfermentans, K. wickerhamii), Scheffersomyces stipitis, Sugiyamaella lignohabitans и Debaryomyces hansenii. Обнаружена корреляция между последовательностями В-галактозидаз и экологическим происхождением штаммов *Kluvveromvces*: молочные продукты и природные источники. Группа молочных штаммов гетерогенна и включает дрожжи K. lactis var. lactis и K. marxianus (99.80-100% сходства), что указывает на общее происхождение их генов LAC4. Филогенетический анализ β-галактозидаз указывает на близкое генетическое родство молочных и госпитальных штаммов K. lactis var. lactis и K. marxianus. Клинические изоляты способны сбраживать лактозу и, по-видимому, происходят от молочных дрожжей.

Ключевые слова: дрожжи-аскомицеты *Kluyveromyces*, *K. lactis* var. *lactis*, полимерные локусы *LAC*, β-галактозидаза, нуклеотидный и аминокислотный полиморфизм, эволюция **DOI:** 10.31857/S0026898421010109

введение

Наряду с культурными растениями и домашними животными человечество на протяжении многих тысячелетий использует микроорганизмы, прежде всего дрожжи-сахаромицеты, в хлебопечении, виноделии, пивоварении, производстве спирта. К "одомашненным" микроорганизмам можно отнести и молочные дрожжи *Kluyveromyces*, которые часто выделяются из различных молочных продуктов (сыр, молоко, кисломолочные продукты) и придают им приятный аромат и вкус.

Гидролиз дисахарида лактозы до галактозы и глюкозы осуществляется при участии фермента β-галактозидазы [К.Ф 3.2.1.23]. У дрожжей *Kluyveromyces* лактоза гидролизуется внутриклеточной β-галактозидазой, поэтому для транспорта сахара в клетку необходимы соответствующие пермеазы. Следует отметить, что известно более 700 видов дрожжей-аскомицетов, из которых лактозу способны утилизировать только около 1%. Помимо дрожжей *Kluyveromyces*, этим свойством обладают только некоторые виды *Candida*, *Debaryomyces* и *Scheffersomyces*.

В настоящее время род *Kluyveromyces* включает семь видов: наземные *K. lactis, K. marxianus, K. dobzhanskii* и *K. wickerhamii*, а также морские *K. aestuarii*, *K. nonfermentas* и *K. siamensis* [1, 2]. В свою очередь, вид *K. lactis* имеет сложный состав и включает две разновидности: молочные дрожжи *K. lactis* var.

lactis и не сбраживающие лактозу природные изоляты K. lactis var. drosophilarum. Виды рода Kluvvero*тусе* существенно различаются по способности утилизировать лактозу. Дрожжи K. lactis var. lactis и молочные штаммы K. marxianus способны ферментировать лактозу, тогда как *K. aestuarii*, *K. siamensis*, *K. nonfermentans*, *K. wickerhamii* и природные изоляты *К. marxianus* ассимилируют лактозу, но не способны ее ферментировать из-за зависимого от дыхания низкоаффинного транспорта лактозы [3-5]. Дрожжи К. dobzhanskii и К. lactis var. drosophilarum не утилизируют лактозу и не имеют даже молчащих генов LAC [6]. Система генов ферментации лактозы хорошо изучена на одном штамме дрожжей K. lactis var. lactis NRRL Y-1140, который является родоначальником генетических линий [7–11]. У этого штамма идентифицированы тесно сцепленные гены LAC4 и LAC12, кодирующие, соответственно, β-галактозидазу и пермеазу лактозы, а также регуляторные гены. Ранее при скрещивании штаммов NRRL Y-1118 и NRRL Y-1140 (оба выделены из сливок в США) обнаружили полимерные лактозные локусы LAC1 и LAC2 [12]. У гибридов этих штаммов в мейозе наблюдалось дигенное полимерное расщепление по способности ферментировать лактозу. Сцепление генов LAC4 и LAC12 в локусах LAC1 и LAC2 позднее установили путем тетрадного анализа гибридов штаммов NRRL Y-1118 (LAC1) и NRRL Y-1140 (LAC2) с природными штаммами K. lactis var. drosophillarum, у которых нет этих генов [4]. Эти локусы имеют различную хромосомную локализацию: LAC1 (хромосома II) и LAC2 (хромосома III) [4, 13]. Третий полимерный локус LAC3, расположенный в хромосоме IV, обнаружен нами у штаммов K. lactis var. lactis, выделенных из молочных продуктов в Советском Союзе [14]. Полиморфизм генов β-галактозидазы дрожжей K. lactis paнее не изучали. В базе данных GenBank представлены нуклеотидные последовательности гена LAC4 только трех штаммов K. lactis var. lactis: NRRL Y-1140 (выделен из сливок в США), F61 (молоко) и GG799 (пищевая промышленность, США). Все эти штаммы содержат локус *LAC2*.

В настоящей работе молекулярно-генетическое изучение генов β-галактозидазы *LAC4* дрожжей *Kluyveromyces* проведено на материале штаммов различного происхождения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования. Используемые в работе штаммы *КLuyveromyces* приведены в табл. 1. Дрожжи культивировали при 28°С на полной среде YPD, г/л: бактоагар — 20, глюкоза — 20, дрожжевой экстракт — 10 и пептон — 20.

ПЦР. Дрожжевую ДНК выделяли при помощи набора Genomic DNA Purification Kit ("Fermentas", Литва). Дизайн олигонуклеотидных прайме-

ров для амплификации и секвенирования генов LAC4 осуществляли онлайн на сайте https:// www.yeastgenome.org. Для амплификации генов LAC4 использовали праймеры MR11 (5'-AT-GTCTTGCCTTATTCCTG-3') и MR14 (5'-GATCTC-GCTTTTGAATAA-3'). ПЦР проводили в 30 мкл буфера, содержащего 2.5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ каждого dNTP, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 ед. акт Тад-полимеразы ("Helicon", Россия), 20-200 нг ДНК по следующей схеме: начальная денатурация при 94°С в течение 3 мин; затем 30 циклов в режиме: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров при 56° C – 30 с, синтез ДНК при 72° C – 60 с; конечная достройка при 72°С – 10 мин. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1%-ном агарозном геле при 60-65 В в 0.5 × ТВЕ-буфере (45 мМ Трис-HCl pH 8.0, 10 мМ EDTA, 45 мМ борная кислота) в течение 1–1.5 ч. Гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе Vilber Lourmat (Франция). В качестве маркера молекулярных масс использовали препарат "1 kb DNA Ladder" ("Thermo Fisher", CIIIA).

Определение нуклеотидных последовательностей и филогенетический анализ. Амплифицированные фрагменты генов LAC4 элюировали из геля при помощи набора Cleanup Mini ("Евроген", Москва) согласно протоколу фирмы-изготовите-Нуклеотидные последовательности генов ля. LAC4 определяли по двум цепям при помощи двух пар праймеров: MR11/MR14 и MR12 (5'-CGAAGCTTGTTATGGCAG-3')/MR13 (5'-CGC-GTACTTAGACAGAGC-3') с помощью прямого секвенирования по методу Сенгера на автоматическом секвенаторе "Applied Biosystems 3730" (США). Последовательности анализировали, используя программу SeqMan package ("DNA Star Inc.", США).

Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями генов *LAC4* проводили с помощью программы BLAST в базе данных GenBank. Множественные выравнивания изученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили, используя программу BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbour-Joining) в программе MEGA 7 [15].

Пульс-электрофорез хромосомных ДНК (молекулярное кариотипирование) и Саузерн-гибридизация. Условия приготовления препаратов хромосомной ДНК описаны ранее [16]. Электрофоретическое разделение хромосомных ДНК проводили на аппарате CHEF-DR III фирмы "Bio-Rad" (США) в 0.8%-ном агарозном геле с использованием трехступенчатого режима: 1) 175 В, 8 ч, время переключения полей 40–120 с; 2) 130 В, 24 ч, время переклю-

Штамма и его номер	Источник и место выделения	Локус <i>LAC</i>			
	Kluyveromyces lactis var. lactis				
CBS 683 (T)	Мягкий сыр, Великобритания	LAC2			
NRRL Y-1140	Сливки, США	То же			
SM 3.8	Сыр Камамбер, Франция	<i>»</i>			
SM 5.8	То же	<i>»</i>			
SM 6.7	»	<i>»</i>			
SM 16.9	»	»			
SM 48.7	»	<i>»</i>			
CBS 762	Сливки, США	<i>»</i>			
CBS 845	Молоко, Великобритания	<i>»</i>			
CBS 1065	Молоко	»			
CBS 1797	Мокрота, Норвегия	»			
CBS 2360	Молоко	»			
CBS 2619	Сливки, США	»			
CBS 5618	Мокрота, Норвегия	»			
CBS 8043	Кишечник ребенка, Новая Зеландия	»			
ВКПМ Ү-3737	Почва, Измайловский парк, Москва, Россия	<i>»</i>			
H1	Почва, Измайловский парк, Москва, Россия	»			
H2	Почва, Измайловский парк, Москва, Россия	<i>»</i>			
H3	Почва, Измайловский парк, Москва, Россия	<i>»</i>			
GG799	Пищевая промышленность, США	<i>»</i>			
F61	Молоко	<i>»</i>			
NRRL Y-1118	Сливки, США	LAC1			
CBS 1067	Молоко, Нидерланды	То же			
BKM Y-762	Сливки, США	»			
BKM Y-869	Кислое молоко, Кольский полуостров, Россия	»			
BKM Y-870	Чал, Туркмения	»			
BKM Y-896	Мягкий сыр, Италия	»			
BKM Y-1527	Мокрота, Испания	»			
BKM Y-1186	Молоко, Киев, Украина	LAC3			
BKM Y-1333	Кислое молоко, Ставропольский край, Россия	То же			
BKM Y-1339	Сметана, Санкт-Петербург, Россия	»			
BKM Y-1343	Молоко, Гомельская обл., Беларусь	»			
BKM Y-1868	Чал, Туркмения	LAC1/LAC3			
UCM Y-328	Кефир, Киев, Украина	LAC1/LAC2			
ВКПМ Ү-492	Молочная сыворотка, Украина	LAC1/LAC2			
	Kluyveromyces marxianus	·			
CBS 397	Йогурт, Нидерланды	LAC			
B0399	Творог, Италия	То же			
UFV-3	Молоко, Бразилия	»			
L03	Молочный продукт	»			
100656-19	Кровь человека, Нидерланды	*			
NBRC 1777	Почва, Япония	<i>»</i>			

Таблица 1. Происхождение штаммов дрожжей *Kluyveromyces*

Таблица 1	I. (Экончание
-----------	------	-----------

Штамма и его номер	Штамма и его номер Источник и место выделения							
CBS 6556	Ферментированное кукурузное тесто, Мексика	»						
DMKU3-1042	Почва, Тайланд	»						
FIM1	Спина коровы, Нидерланды	»						
DMB1	Гидролизат сахарного тростника	»						
UFS-Y2791	Сок Agave americana, Южная Африка	»						
Kluyveromyces dobzhanskii								
CBS 2104 (T)	Drosophila pseudoobscura, Калифорния, США	»						
	Kluyveromyces wickerhamii	,						
CBS 2745 (T)	Drosophila sp., Калифорния, США	»						
Kluyveromyces aestuarii								
CBS 4438 (T)	Морская грязь, Флорида, США	»						
Kluyveromyces nonfermentans								
CBS 8778 (T)	Ил, залив Сагами, Япония	»						
Kluyveromyces siamensis								
CBS 10860 (T)	Вода мангрового леса, Тайланд	»						
	Scheffersomyces stipitis	'						
CBS 6054	Неизвестно	»						
Sugiyamaella lignohabitans								
CBS 10342 (T)	Гнилое бревно, Иллинойс, США	»						
Debaryomyces hansenii								
CBS 767 (T)	Неизвестно	»						

Примечание. Сокращенные названия коллекций: BKM – Всероссийская коллекция микроорганизмов, Пущино, Москва; BKПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, Москва, Россия; CBS – The Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Утрехт, Нидерланды; SM – J.P. Schmidt, Institut National Agronomique, Париж-Гриньон, Франция; NRRL – USDA-ARS Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research, Пеория, США; UCM – Украинская коллекция микроорганизмов, Институт микробиологии и вирусологии НАН, Киев, Украина; NBRC/IFO – National Institute of Technology and Evaluation, Токио, Япония; UCDFST – Phaff Yeast Collection, University of California, Дэвис, США. Соответствие штаммов различных коллекций: CBS 683=BKM Y-868, NRRL Y-1140 = CBS 2359, NRRL Y-1118 = CBS 6315, CBS 6556 = KCTC 17555. FIM1 = CBS 4857, CBS 2745 = UCDFST 54-210, CBS 4438 = NRRL YB-4510, CBS 8778 = NRRL Y-27343. T – типовая культура.

чения полей 120–360 с; 3) 100 В, 8 ч, время переключения полей 360–1200 с. В качестве буфера использовали 0.5 × ТВЕ, охлажденный до 14°С. В качестве кариотипических стандартов использовали коммерческие препараты ДНК штаммов Saccharomyces cerevisiae YNN 295 (=ATCC 20358) и Wickerhamomyces canadensis (syn. Hasenula wingei) YB-4662-VIA (=ATCC 28162) ("Bio-Rad", США). После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием, промывали в дистиллированной воде и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Хромосомную ДНК переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя аппарат Vacuum blotter ("BioRad"). ДНК фиксировали на мембране путем отжига при 80°С в течение 2 ч. В качестве зонда использовали ПЦР-амплифицированный фрагмент гена *LAC4* штамма *K. lactis* var. *lactis* NRRL Y-1140. Метку вводили нерадиоактивным методом с использованием дигоксигенина (digII-dUTP) из набора "DIG High Prime DNA Labeling Detection Starter Kit I" ("Roche", Швейцария). Гибридизацию и детекцию гибридизационных сигналов проводили по протоколу фирмы-изготовителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярное кариотипирование и Саузерн-гибридизация

С помощью пульс-электрофореза и Саузернгибридизации хромосомной ДНК с зондом *LAC4* мы провели молекулярный скрининг генов β-галактозидазы у 33 сбраживающих лактозу штаммов дрожжей *K. lactis* var. *lactis* различного экологического и географического происхождения (табл. 1). Штаммы выделены в различных регионах бывшего СССР, Европы, США и Новой Зеландии из молочных продуктов, почвы и клинических

a





Рис. 1. Пульс-электрофорез хромосомных ДНК дрожжей *K. lactis* var. *lactis* (*a*) и Саузерн-гибридизация с зондом *LAC4* (*б*). Дорожки: *K1 – W. canadensis* (хромосомный стандарт); *K2 – S. cerevisiae* YNN 295 (хромосомный стандарт); *K. lactis* var. *lactis*: *1* – NRRL Y-1140; *2* – NRRL Y-1118; *3* – CBS 683; *4* – BKM Y-869; *5* – BKM Y-870, *6* – BKM Y-1186; *7* – BKM Y-1333; *8* – CBS 762; *9* – BKM Y-1339; *10* – BKM Y-1343; *11* – BKM Y-1868; *12* – BKM Y-762; *13* – BKM Y-896; *14* – BKM Y-1527; *15* – SM 3.8; *16* – SM 5.8; *17* – SM 6.7; *18* – SM 16.9; *19* – SM 48.7; *20* – UCM Y-328; *21* – CBS 845; *22* – CBS 1065; *23* – CBS 1067; *24* – CBS 1797; *25* – CBS 2360; *26* – CBS 2619; *27* – CBS 5618; *28* – CBS 8043; *29* – BKПМ Y-492; *30* – BKПМ Y-3737; *31* – H1; *32* – H2; *33* – H3. Размеры хромосом (т.п.н.) приведены по кариотипическим стандартам *S. cerevisiae* YNN 235 и *W. canadensis* YB-4662-VIA. Xp. – хромосома.

источников (мокрота, кишечник). На рис. 1а приведены кариотипические профили 33 изученных штаммов. Размеры отдельных хромосом определяли по кариотипам стандартных штаммов W. canadensis YB-4662-VIA и S. cerevisiae YNN 295 (рис. 1а, дорожки 1 и 2). Изученные штаммы характеризуются сходными молекулярными кариотипами с шестью хромосомными полосами размером от 1050 до 2800 т.п.н. (рис. 1а). Отмечен некоторый полиморфизм размеров хромосом II и III. Гибридизация с зондом *LAC4* выявила локус LAC1 у семи штаммов, LAC2 – у 19 и LAC3 у четырех (рис. 1б). У штаммов UCM Ү-328 и ВКПМ Y-492, выделенных из молочных продуктов на Украине, обнаружены полимерные локусы LAC1 и LAC2 (рис. 16, дорожки 20 и 29). Выделенный из чала в Туркмении штамм ВКМ У-1868 имеет полимерные гены LAC1 и LAC3 (рис. 16, дорожка 11). Нами не отмечена корреляция между происхождением штаммов и присутствием определенных локусов LAC (табл. 1). Например, клинические изоляты CBS 5618 и CBS 8043, выделенные, соответственно, из мокроты в Норвегии и кишечника ребенка в Новой Зеландии, содержат локус LAC2 (табл. 1). Также европейский штамм ВКМ У-1527 (мокрота, Испания) содержит локус LAC1. Независимо от источника выделения (молочные продукты, почва и клинические изоляты) большинство изученных штаммов обладали локусом *LAC2* (табл. 1).

Нуклеотидный полиморфизм генов LAC4 дрожжей Kluyveromyces

Мы провели секвенирование генов LAC4 различной хромосомной локализации у 11 штаммов K. lactis var. lactis: локус LAC1 (NRRL Y-1118, BKM Y-869, BKM Y-870 и BKM Y-1527), LAC2 (CBS 683, ВКПМ Y-3737 и SM 48.7) и LAC3 (ВКМ Y-1186, ВКМ Ү-1333, ВКМ Ү-1339 и ВКМ Ү-1343) (табл. 1). В анализ вошли штаммы, выделенные из молочных продуктов, почвы и в клиниках. Полученные нуклеотидные последовательности сравнили между собой и с последовательностями генов LAC4 локуса LAC2 штаммов NRRL Y-1140, F61 и GG799, депонированными в базу данных Gen-Bank. Последовательности генов LAC4 у штаммов, обладающих локусом LAC1, были идентичными или отличались 1-2 нуклеотилами. У штаммов с локусом LAC2 обнаружено от 0 до 3 замен в нуклеотидных последовательностях генов LAC4. Все четыре изученных нами штамма с локусом LAC3 имели идентичные последовательности генов β-галактозидазы. Гены LAC4 локусов LAC1, LAC2 и LAC3 различались 1-5 нуклеотидами, наибольшее количество замен выявлено в гене β-галактозидазы локуса



Puc. 2. Φилогенетическое дерево аминокислотных последовательностей β-галактозидаз дрожжей рода *Kluyveromyces*. В качестве внешней группы использовали β-галактозидазы дрожжей *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, *Sugiyamaella lignohabitans* CBS 10342, *Debaryomyces hansenii* CBS 767. Приведены значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 20 заменам на 100 аминокислотных позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов с идентичными аминокислотными последовательностями: (1) – BKM Y-1186 (MT469912), BKM Y-1339 (MT469915), BKM Y-1343 (MT469914); (2) – SM 48.7 (MT469911); (3) – NRRL Y-1140 (XP_452194.1), BKM Y-1527-7A (MT469908), F61 (KF420203.1); (4) – GG799; (5) – BKM Y-870 (MT469906); (6) – B0399 (CM004407.1), 100656-19 (CABJCX010000079.1), UFV-3 (SRX3637959), L03 (SRX3541362); (7) – DMB1 (BBIL00000000.1), NBRC 1777 (AP014601.1), CBS 6556 (KQ039400.1). После номера штамма приведены регистрационные номера последовательностей B GenBank.

LAC3. Анализ спектра нуклеотидных замен показал, что наиболее часто встречаются транзиции типа С \rightarrow Т, большинство из которых представлены расположенными в третьем положении кодона молчащими заменами, не вызывающими изменений в аминокислотной последовательности кодируемого белка. Мы также секвенировали ген *LAC4* молочного штамма *К. marxianus* CBS 397, выделенного из йогурта в Нидерландах. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *LAC4* дрожжей *К. lactis* var. *lactis* и *К. marxianus* CBS 397 выявил их большое сходство и всего 1–3 нуклеотидные замены.

В базе данных GenBank представлены нуклеотидные последовательности геномов типовых культур K. aestuarii, K. nonfermentans и K. wickerhamii, а также 10 штаммов K. marxianus, выделенных из молочных продуктов и различных природных источников (табл. 1). Нуклеотидные последовательности генов В-галактозидазы штаммов К. marxianus молочного происхождения (B0399, UFV-3 и L03) и клинического изолята 100656-19, выделенного из крови человека, были идентичными и не отличались от последовательности штамма CBS 397. С другой стороны, сходство нуклеотидных последовательностей генов LAC4 природных штаммов K. marxianus составило 92.88-98.34%. Последовательности генов LAC4 молочных и природных штаммов K. marxianus

различались более 60 заменами. В целом, нуклеотидные последовательности генов β-галактозидаз дрожжей *K. lactis* var. *lactis* и *K. marxianus* сходны на 89.94–99.97%, тогда как уровень их сходства с генами *LAC4* типовых культур *K. wickerhamii* CBS 2745, *K. aestuarii* CBS 4438 и *K. nonfermentans* CBS 8778 не превышал 70%.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей β-галактозидаз дрожжей Kluyveromyces

По полученным нуклеотидным последовательностям генов LAC4 были определены первичные структуры соответствующих белков, состоящих из 1025 аминокислотных остатков. В сравнительный анализ были также включены β-галактозидазы дрожжей Scheffersomyces stipitis CBS 6054, Sugiyamaella lignohabitans CBS 10342 и Debaryomyces hansenii CBS 767. На основании анализа изученных аминокислотных последовательностей построено филогенетическое дерево (рис. 2). В-Галактозидазы дрожжей рода Kluyveromyces сформировали отдельный кластер со 100%-ной статистической поддержкой. Внутри этого кластера выделяют два основных подкластера. Первый представлен аминокислотными последовательностями LAC4 штаммов K. lactis var. lactis и K. marxianus, идентичными на 94.00-100%. Этот подкластер включает

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ LAC4



Рис. 3. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 гена 26S pPHK и участка ITS1-5.8S-ITS2 дрожжей *Kluyveromyces*. В качестве внешней группы использовали последовательности дрожжей *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, *Sugiyamaella lignohabitans* CBS 10342 (T), *Debaryomyces hansenii* CBS 767 (T). Приведены значения бутстрепа >70%. Шкала соответствует 50 нуклеотидным заменам на 1000 позиций. Цифрами в скобках обозначены группы штаммов, имеющие идентичные последовательности: (1) – CBS 712T (U94924/AY046214), B0399 (CM004409), 100656-19 (CABJCX010000020), NBRC 1777 (AB771427/AB771426), CBS 6556 (KY108061/KY103826), DM-KU3-1042 (AP012217), FIM1 (KY108083/KY103823), DMB1 (GCA_000747785); (2) – UFV-3 (CP009307); (3) – NRRL Y-1140 (KY108038/ KY103771), GG799 (KY103771/CP021242); После номера штамма приводены регистрационные номера последовательностей в GenBank. T – типовая культура.

две группы штаммов: молочные дрожжи K. lactis var. lactis и К. marxianus (99.80-100% сходства) и природные изоляты, β-галактозидазы которых идентичны на 94.25-98.34%. Наиболее дивергентной является β-галактозидаза штамма *K. marxianus* UFS-Y2791, выделенного из Agave americana в Южной Африке. Второй подкластер включает белки LAC4 дрожжей K. wickerhamii, K. aestuarii и K. nonfermentans. Наибольшее сходство имеют β-галактозидазы K. aestuarii и K. nonfermentans (79.98%), идентичные белку LAC4 K. wickerhamii на 72.77 и 69.60% соответственно. Сходство В-галактозидаз двух подкластеров составило 63.67-70.37%. Отдельное положение на дереве занимают лактазы других родов дрожжей: Scheffersomyces, Sugiyamaella и Debaryomyces, сходство которых с β-галактозидазами дрожжей Kluyveromyces не превышало 45%.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 и ITS-участка рДНК

Современная классификация дрожжей-аскомицетов основана на филогенетическом анализе ряда молекулярных маркеров, прежде всего домена D1/D2 гена 26S pPHK и 5.8S-ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S PHK и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS2. На основании депонированных в GenBank нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 и ITS-участка дрожжей *Kluyveromyces* построено филогенетическое дерево (рис. 3). Дрожжи *Kluyveromyces* со 100%-ной статистической значимостью сформировали отдельный кластер, который, в свою очередь, разделен на два подкластера. Первый включает сухопутные виды K. lactis, K. marxianus, К. dobzhanskii и К. wickerhamii, а второй – морские виды K. aestuarii, K. nonfermentas и K. siamensis. Дрожжи K. lactis и K. marxianus имеют практически идентичные домены D1/D2, но значимо различаются последовательностями ITS1-участка: 23 нуклеотидные замены. Штаммы *K. lactis* var. lactis, молочные (CBS 683 и NRRL Y-1140) и не молочные (GG799), имели идентичные последовательности D1/D2 и ITS. Штаммы K. marxianus разделились на две группы, ITS1 которых различались двумя нуклеотидными заменами. Первая группа включает молочные штаммы (CBS 397 и В0399), клинический изолят 100656-19 и штаммы не молочного происхождения (NBRC 1777, CBS 6556, DMKU3-1042, FIM1 и DMB1). Два молочных штамма LO3 и UFV-3 составили вторую группу. Деление на группы не связано с географическим происхождением штаммов и способностью ферментировать лактозу.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На материале штаммов *K. lactis* var. *lactis* различного происхождения впервые проведен молекулярный скрининг генов *LAC4*, контролирующих ферментацию лактозы. У этих дрожжей способность ферментировать лактозу контролируется по крайней мере тремя полимерными локусами *LAC* различной хромосомной локализации: *LAC1* (хромосома III), *LAC2* (хромосома II) и *LAC3* (хромосома IV).

В целом, топологии деревьев, построенных на основании аминокислотных последовательно-

стей β-галактозидаз и нуклеотидных последовательностей домена D1/D2 и ITS-участка рДНК хорошо согласуются: со 100%-ной статистической значимостью выделяются кластеры, объединяющие виды рода Kluyveromyces, а молочные дрожжи K. lactis и K. marxianus являются наиболее близкородственными (рис. 2 и 3). В то же время имеются некоторые различия, связанные, по-видимому, с отсутствием видов K. dobzhanskii и K. siamensis на дереве, построенном по аминокислотным последовательностям β-галактозидаз. Так, на дереве рибосомных последовательностей наземные и морские виды *Kluyveromyces* разделены на два четких подкластера, тогда как на втором дереве βгалактозидаза наземных дрожжей K. wickerhamii примыкает к β-галактозидазам морских видов *K*. aestuarii и *K*. nonfermentans.

Филогенетический анализ выявил значительные различия между белками LAC4 дрожжей рода Kluyveromyces (K. lactis, K. marxianus, K. aestuarii, K. nonfermentans, K. wickerhamii), Scheffersomyces stipitis, Sugiyamaella lignohabitans и Debaryomyces hansenii. β-Галактозидазы Kluyveromyces идентичны на 63.67-100%. Наибольшим сходством обладают β-галактозидазы штаммов *K. lactis* var. lactis и K. marxianus: 94.00-100%. С другой стороны, белки LAC4 дрожжей K. marxianus разделились на две группы, соответствующие происхождению штаммов: молочные продукты и природные источники. Следует отметить близкое генетическое родство молочных и госпитальных штаммов K. lactis var. lactis и K. marxianus. Paнee мы показали, что клинические изоляты K. lactis var. *lactis* по многим молекулярным маркерам не отличаются от штаммов, выделенных из молочных продуктов [16]. Принимая по внимание способность клинических штаммов сбраживать лактозу, они, очевидно, происходят от молочных дрожжей. Ряд характеристик, свойственных патогенным дрожжам, уже присущи госпитальным штаммам K. marxianus: образование псевдомицелия, устойчивость к повышенной температуре и высокая пектолитическая активность [17]. Обнаружены также клинические изоляты S. cerevisiae, по многим молекулярным маркерам сходные с пекарскими штаммами [18-21].

С помощью комплементационного анализа при гибридизации с lac-тестерами K. lactis var. lactis paнee установлено, что молочные, клинические и природные штаммы K. marxianus обладают активными генами LAC4, но имеют различные типы пермеаз лактозы [3]. На специальной среде с ингибитором дыхания антимицином A показано, что молочные и клинические штаммы содержат не зависящую от дыхания сильную пермеазу лактозы, тогда как природные изоляты характеризуются зависящей от дыхания слабой пермеазной активностью. Феномен ассимиляции сахаров дрожжами в аэробных условиях и неспособность

их сбраживать в анаэробных условиях получил название эффекта Клюйвера [22, 23]. С помощью антимицина А установлена зависимость многих ферментов K. lactis от дыхания, в том числе и пермеазы глюкозы [24]. Низкой активностью пермеазы лактозы обладают также дрожжи K. wicker*hamii*, способные только ассимилировать лактозу [25]. В то же время эти дрожжи имеют активный ген LAC4. Генетические данные очень хорошо согласуются с результатами недавно проведенного сравнительного анализа пермеазных генов LAC12 у штаммов *К. marxianus* различного происхождения [5, 26]. На основании геномного анализа штаммов Kluyveromyces, депонированных в Gen-Bank, реконструирована история эволюции генов утилизации дисахаридов – лактозы и целлобиозы. Показано, что предковый белок LAC12 был бифункциональным и участвовал в транспорте обоих дисахаридов внутрь клетки, затем LAC4 гидролизовал лактозу, а CEL2 – целлобиозу. В процессе эволюции дрожжи K. marxianus и K. nonfermentans утратили собственно транспортер целлобиозы CEL1, который сохранился у остальных видов рода Kluyveromyces. У дрожжей K. marxianus вместе с потерей CEL1 произошла дупликация гена LAC12, в результате которой образовались четыре копии, локализованные в субтеломерных районах различных хромосом: 8 и 2 и оба плеча хромосомы 3. Однако только расположенный в левом плече хромосомы 3 предковый ген LAC12 кодирует функциональную пермеазу лактозы, а остальные копии участвуют в транспорте другого дисахарида – целлобиозы [5]. У неспособных ферментировать лактозу природных штаммов K. marxianus белок LAC12 отличается 13 заменами от соответствующего белка молочных и госпитальных штаммов [26]. Независимо от источника выделения, все изученные штаммы *К. marxianus* обладали функциональным геном LAC4 (хромосома 3L), тогда как остальные копии (хромосомы 8, 2 и правое плечо хромосомы 3) были утрачены или вырождены в псевдогены [26].

Дрожжи K. lactis var. lactis и K. marxianus совместно обитают в молочных продуктах и, обладая общей системой типов спаривания, могут образовывать межвидовые гибриды [27]. По-видимому, доместикация молочных дрожжей K. lactis var. lactis произошла на основе приобретения генного кластера LAC4-LAC12 от молочных штаммов K. marxianus [6]. В свою очередь, дрожжи К. marxianus могли приобрести "лактозные" гены в результате горизонтального переноса соответствующих генов от бактерий [28]. Наше предположение подтверждено Varela и соавт. [5]. Проведенное ранее секвенирование и аннотация генома типовой культуры K. lactis var. drosophilarum CBS 2105, выделенной из Drosophila sp. (США), не обнаружило последовательностей генов LAC4 и LAC12, что полностью согласуется с проведенным нами Сау-

зерн-блотингом [6]. Известно, что у штамма K. lactis var. lactis NRRL Y-1140 и дрожжей K. marxianus генный кластер LAC4-LAC12 расположен, соответственно, в субтеломерной области хромосом IIR и 3L [11, 26, 29]. С помощью точечно-матричного анализа (dot matrix plots) проведено сравнение субтеломерных областей указанных хромосом у K. lactis var. lactis NRRL Y-1140, K. lactis var. drosophilarum CBS 2105 и трех штаммов K. marxianus: L03 (молочный продукт), NBRC 1777 (почва) и UFS Y-2791 (сок Agave americana) [5]. Если сходство нуклеотидных последовательностей хромосом IIR и 3L на большей части длины составляет всего 63.4-64.5%, то, начиная с кластера *LAC4–LAC12*, оно резко возрастает до 99.8% (штамм L03), 96.1% (NBRC 1777) и 85.1% (UFS Y-2791). С другой стороны, у разновидностей *К. lactis* нуклеотидные последовательности правого плеча второй хромосомы идентичны на 94.1%, за исключением субтеломерного участка длиной около 15 т.п.н., в котором расположен генный кластер *LAC4–LAC12*. По-видимому, в результате межвидовой гибридизации произошел перенос лактозного кластера из молочного штамма K. marx*ianus* в правое плечо хромосомы II дрожжей *K. lactis*. Следует отметить, что большинство изученных нами штаммов K. lactis var lactis содержали локус LAC2 (рис. 1б). Причем этим локусом обладали как молочные, госпитальные, так и четыре природных штамма (ВКПМ Ү-3737, Н1, Н2 и Н3), выделенные нами в свое время из почвы в Измайловском парке Москвы [30]. Локусы LAC1 и LAC3 могли произойти от локуса *LAC2* в процессе внутривидовой гибридизации за счет рекомбинации гомологичных субтеломерных последовательностей различных хромосом. Хорошо известно, что повторяющиеся субтеломерные последовательности являются горячими точками внутри- и межхромосомных рекомбинационных событий. На дрожжах Saccharomyces показан природный межвидовой перенос многих субтеломерных генов, включая гены ферментации различных сахаров [31, 32]. Интрогрессия кластера генов β-галактозидазы (LAC4) и пермеазы лактозы (LAC12) в геном дрожжей K. lactis var. lactis, по-видимому, совпала по времени с одомашниванием "молочных" видов животных [5, 33].

Анализ нуклеотидных последовательностей генов пермеазы лактозы у разных штаммов *K. lac-tis* var. *lactis* позволит прояснить происхождение их полимерных локусов *LAC* и получить ценную информацию в области генетики адаптивных ферментационных признаков. В настоящее время мы проводим гибридологический анализ штаммов, обладающих разными локусами *LAC*, и секвенирование пермеазных генов *LAC12*.

Работа поддержана российско-тайваньским грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-54-52002 МНТ_а). 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. Kurtzman C.P. (2003) Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces, Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vanderwaltozyma* and *Zygotorulospora. FEMS Yeast Res.* **4**, 233–245.
- Lachance M.-A., Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. (2011) *Kluyveromyces* van der Walt (1971). In: *The Yeasts. A Taxonomic Study.* Eds Kurtzman C.P., Fell J.W. Amsterdam: Elsevier, 471–482.
- 3. Наумов Г.И. (2006) Генетика полиморфизма утилизации лактозы у дрожжей *Kluyveromyces marxianus. ДАН.* **409**(3), 422–424.
- 4. Наумов Г.И. (2008) Обнаружение суперсемейств лактозных генов *LAC* у дрожжей *Kluyveromyces*. *ДАН*. **420**(6), 832–834.
- Varela J.A., Puricelli M., Ortiz-Merino R.A., Giacomobono R., Braun-Galleani S., Wolfe K.H., Morrissey J.P. (2019) Origin of lactose fermentation in *Kluyveromyces lactis* by interspecies transfer of a neofunctionalized gene cluster during domestication. *Curr. Biol.* 29, 4284–4290.
- Наумов Г.И., Наумова Е.С., Баррио Е., Керол А. (2006) Генетическое и молекулярное изучение неспособности дрожжей *Kluyveromyces lactis* var. *drosophilarum* сбраживать лактозу. *Микробиология*. **75**, 299–304.
- Riley M.I., Sreekrishna K., Bhairi S., Dickson R.C. (1987) Isolation and characterization of mutants of *Kluyveromyces lactis* defective in lactose transport. *Mol. Gen. Genet.* 208, 145–151.
- Dickson R.C., Riley M.I. (1989) The lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*. in: *Yeast Genetic Engineering*. Eds Barr P.J., Brake A.J., Valenzuela P. Boston: Butterworth Publ., 19–40.
- Gödecke A., Zachariae W., Arvanitidis A., Breunig K.D. (1991) Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β-galactosidase genes is achieved by interaction of multiple *LAC9* binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. *Nucl. Acids Res.* 19, 5351–5358.
- Breunig K.D., Bolotin-Fukuhara M., Bianchi M.M., Bourgarel D., Falcone C., Ferrero I., Frontali L., Goffrini P., Krijger J.J., Mazzoni C., Milkowski C., Steensma H.Y., Wésolowski-Louvel M., Zeeman A.M. (2000) Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis. Enz. Microb. Techn.* 26, 771–780.
- Fairhead C., Dujon B. (2006). Structure of *Kluyvero-myces lactis* subtelomeres: duplications and gene content. *FEMS Yeast Res.* 6, 428–441.
- Herman A., Halvorson H. (1963) Identification of the structural gene for beta-glucosidase in *Saccharomyces lactis. J. Bacteriol.* 85(4), 895–900.
- 13. Wesolowski-Louvel M., Fukuhara H. (1995) A map of the *Kluyveromyces lactis* genome. *Yeast.* **11**, 211–218.

- 14. Наумов Г.И., Наумова Е.С. (2014) Полимерные гены ферментации лактозы у дрожжей Kluyveromyces lactis: новый локус LAC3. ДАН. 455(3), 363-365.
- 15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33(7), 1870-1874.
- 16. Наумова Е.С., Сухотина Н.Н., Наумов Г.И. (2005) Молекулярные маркеры, дифференцирующие молочные дрожжи Kluyveromyces lactis var. lactis от их ближайших диких родственников – европейской популяции "krassilnikovii". Микробиология. 74(3), 387-393.
- 17. Çuhadar T., Kalkancı A. (2017) Emerging pathogen: Candida kefyr (Kluvyeromyces marxianus). Mikrobiyol. Bul. 51(4), 387-395. https://doi.org/10.5578/mb.61813
- 18. Hennequin C., Thierry A., Richard G.F., Lecointre G., Nguyen H.-V., Gaillardin C., Dujon B. (2001) Microsatellite typing as a new tool for identification of Saccharomyces cerevisiae strains. J. Clin. Microbiol. 3, 551-559.
- 19. de Llanos R., Querol A., Planes A.M., Fernandez-Espinar M.T. (2004) Molecular characterization of clinical Saccharomyces cerevisiae isolates and their association with non-clinical strains. Syst. Appl. Microbiol. 27(4), 427-435.
- 20. Imre A., Rácz H.V., Antunovics Z., Rádai Z., Kovács R., Lopandic K., Pócsi I., Pfliegler W. P. (2019) A new, rapid multiplex PCR method identifies frequent probiotic origin among clinical Saccharomyces isolates. Microbiol. Res. 227, 126298. https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126298

21. Pfliegler W.P., Boros E., Pázmándi K., Jakab Á., Zsuga I., Kovács R., Urbán E., Antunovics Z., Bácsi A., Sipiczki M., Majoros L., Pócsi I. (2017) Commercial strainderived clinical Saccharomyces cerevisiae can evolve new phenotypes without higher pathogenicity. Mol. Nutr. Food Res. 61(11).

https://doi.org/10.1002/mnfr.201601099

- 22. Fukuhara H. (2003) The Kluyver effect revisited. FEMS Yeast Res. 3, 327-331.
- 23. Fukuhara H. (2006) Kluvveromyces lactis a retrospective. FEMS Yeast Res. 6, 323-324.

- 24. Wesolowski-Louvel M., Goffrini P., Ferrero I., Fukuhara H. (1992) Glucose transport in the yeast Kluvveromyces lactis. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene. Mol. Gen. Genet. 333, 89-96.
- 25. Наумов Г.И. (2005) Почему дрожжи Kluyveromyces wickerhamii ассимилируют, но не сбраживают лактозу? ДАН. 403, 847-849.
- 26. Varela J.A., Montini N., Scully D., Van der Ploeg R., Oreb M., Boles E., Hirota J., Akada R., Hoshida H., Morrissev J.P. (2017) Polymorphisms in the LAC12 gene explain lactose utilisation variability in Kluvveromyces marxianus strains. FEMS Yeast Res. 17(3). https://doi.org/10.1093/femsyr/fox021
- 27. Наумов Г.И. (2005) Доместикация молочных дрожжей Kluvveromvces lactis: перенос кластера генов β-галактозидазы (LAC4) и лактозной пермеазы (LAC12)? ДАН. 401(2), 279-281.
- 28. Poch O., L'Hôte H., Dallery V., Debeaux F., Fleer R., Sodoyer R. (1992) Sequence of the *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. Gene. 118, 55-63.
- 29. Bussereau F., Casaregola S., Lafay J.-F., Bolotin-Fukuhara M. (2006) The Kluyveromyces lactis repertoire of transcriptional regulators. FEMS Yeast Res. 6, 325-335.
- 30. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Глушакова А.М., Качалкин А.В., Чернов И.Ю. (2014) Обнаружение молочных дрожжей Kluyveromyces lactis var. lactis в природе. Микробиология. 83, 677-681.
- 31. Naumova E.S., Naumov G.I., Michailova Yu.V., Martynenko N.N., Masneuf-Pomarède I. (2011) Genetic diversity study of the yeast Saccharomyces bayanus var. uvarum reveals introgressed subtelomeric Saccharomyces cerevisiae genes. Res. Microbiol. 162(2), 204-213.
- 32. Peter J., De Chiara M., Friedrich A., Yue J.-X., Pflieger D., Bergström A., Sigwalt A., Barre B., Freel K., Llored A., Cruaud C., Labadie K., Aury J.-M., Istace B., Lebrigand K., Barbry P., Engelen S., Lemainque A., Wincker P., Liti G., Schacherer J. (2018) Genome evolution across 1.011 Saccharomyces cerevisiae isolates. Nature. 556 (7701), 339-344
- 33. Larson G., Fuller D.Q. (2014) The evolution of animal domestication. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 45, 115-136.

MOLECULAR POLYMORPHISM OF β-GALACTOSIDASE LAC4 GENES IN DAIRY AND NATURAL STRAINS OF Kluvveromyces YEASTS

L. V. Lyutova^{1, 2}, G. I. Naumov¹, A. V. Shnyreva², and E. S. Naumova^{1, *}

¹State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, NRC "Kurchatov Institute", Moscow, 117545 Russia

> ²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia *e-mail: lena naumova@yahoo.com

Dairy yeast Kluyveromyces lactis are capable of fermenting lactose. Notably, vast majority of other yeast species cannot even import lactose to cells. Molecular polymorphism of β -galactosidase genes LAC4 controlling lactose fermentation is practically not studied, and the literature data concerns only one strain of K. lactis var. *lactis* NRRL Y-1140, isolated from cream in the USA. Here we present the karyotyping, Southern hybridization, and sequencing based study of β -galactosidase genes in lactose-fermenting K. lactis strains isolated from dairy products and natural sources in different regions of the world. In dairy yeast K. lactis var. lactis, the ability to ferment lactose is controlled by at least three polymeric LAC loci, LAC1 (chromosome III), LAC2

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ LAC4

85

(chr. II), and *LAC3* (chr. IV), located on different chromosomes. Most of strains possess the *LAC2* locus. Phylogenetic analysis show significant differences between the LAC4 proteins of the genus *Kluyveromyces* (*K. lactis, K. marxianus, K. aestuarii, K. nonfermentans* and *K. wickerhamii*), *Scheffersomyces stipitis, Sugiya-maella lignohabitans* and *Debaryomyces hansenii*, and a correlation between the β -galactosidase sequences and the sources of *Kluyveromyces* strains. The group of milk strains is heterogeneous and includes *K. lactis* var. *lactis* and *K. marxianus* (99.80–100% identity), suggesting the common origin of their *LAC4* genes. Phylogenetic analysis of β -galactosidases indicates a close genetic relationship between dairy and hospital strains of *K. lactis* var. *lactis* and *K. marxianus*. As these clinical isolates are able to ferment lactose, we conclude that they appear to be originated from dairy yeasts.

Keywords: ascomycetous yeast *Kluyveromyces*, dairy yeasts *K. lactis* var. *lactis*, polymeric *LAC* loci, β -galatosidase, nucleotide and amino acid polymorphisms, evolution

УДК 577.218

УРОВЕНЬ sgPHK KAK OCHOBHOЙ ФАКТОР, ВЛИЯЮЩИЙ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ CRISPRi HOKДАУНА В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ K562^{1, 2}

© 2021 г. Y. Wang^a, Y. Xie^b, Z. C. Dong^a, X. J. Jiang^a, P. Gong^a, J. Lu^a, F. Wan^{a, *}

^aCollege of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia, 010010 China
^bCollege of Science, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia, 010010 China

*e-mail: fwan@imau.edu.cn Поступила в редакцию 10.02.2020 г. После доработки 07.04.2020 г. Принята к публикации 27.04.2020 г.

В работе определяли вклад уровня экспрессии неактивной нуклеазы Cas9 (dCas9) и гид-РНК (sgPHK) в эффективность ноклауна системой CRISPR-интерференции (CRISPRi). С этой целью получены клоны клеток K562, продуцирующие белок KRAB-dCas9 на различных уровнях под контролем индуцибельной системы Tet-on или конститутивного промотора SFFV. Отдельные клоны были отобраны с помощью сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) для дальнейшего изучения. В качестве мишеней sgPHK-экспрессирующих лентивирусных векторов из двух библиотек использовали шесть генов в четырех клеточных линиях с различными уровнями экспрессии KRAB-dCas9. Уровни экспрессии KRAB-dCas9/sgPHK и эффективность нокдауна оценивали методом проточной цитометрии. В клоне клеток с наивысшим уровнем экспрессии KRABdCas9 воспроизводимо и статистически значимо наблюдали наиболее эффективный нокдаун. Эти данные указывают на то, что уровень KRAB-dCas9 может определять эффективность CRISPRi. В этом клоне меняли уровень экспрессии sgPHK, манипулируя с множественностью инфекции (MOI) при лентивирусной трансдукции. Обнаружено, что эффективность нокдауна не коррелировала ни с уровнем экспрессии целевого гена, ни с уровнем KRAB-dCas9, который оставался относительно постоянным (коэффициент вариации 2.2%). В случае генов mmadhc, rpia и znf148 эффективность нокдауна составила 74.72, 72.28 и 39.08% соответственно и коррелировала с уровнем экспрессии sgPHK. В ходе анализа линейной регрессионной модели установлено, что на эффективность нокдауна влияет уровень экспрессии как KRAB-dCas9, так и sgPHK. Однако детальные расчеты показывают, что наибольший вклад вносит уровень sgPHK, что позволяет считать его основным фактором, влияющим на эффективность CRISPRi.

Ключевые слова: CRISPR-интерференция, нокдаун, индуцируемая тетрациклином система, множественность инфекции, РНК-гид

DOI: 10.31857/S0026898421010146

введение

Технология CRISPRi постепенно вытесняет методы, основанные на малых интерферирующих РНК (siPHK), в механистических исследованиях функций генов [1]. Однако пока нет исследований по выявлению факторов, определяющих эффективность системы CRISPRi. В целом, на эффективность нокдауна могут влиять уровни двух основных игроков системы: белка dCas9 и направляющей PHK (single-guide RNA; sgPHK).

При репрессии транскрипции гена-мишени обычно используют один из трех белков: KRAB, MeCP2, dCas9 и его синтетические производные [2, 3]. KRAB привлекает KAP1, который служит

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

² Дополнительные материалы для этой статьи доступны по doi 10.31857/S0026898421010146 для авторизованных пользователей. Принятые сокращения: ANOVA (analysis of variance) – дисперсионный анализ; BFP (blue fluorescent protein) – синий флуоресцентный белок; CRISPRi (CRISPR interference) – CRISPR-интерференция; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла; FACS (fluorescence-activated cell sorting) – флуоресцентная сортировка клеток; FBS (fetal bovine serum) – эмбриональная телячья сыворотка; IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) – среда Дульбекко с модификацией Искова; MFI (median fluorescence intensity) – средняя интенсивность флуоресценции; MOI (multiplicity of infection) – множественность инфекции; PEI (polyethylenimine) – полиэтиленимин; sgRNA (single-guide RNA) – направляющая PHK; siPHK (small interfering RNA) – малая интерферирующая PHK.

каркасом для различных факторов, индуцируюших образование гетерохроматина [4]: МеСР2 связывается с метилированной ДНК и привлекает гистондеацетилазу и корепрессор SIN3A [5]. Показано, что комбинация dCas9 с KRAB и МеСР2 повышает эффективность ноклауна [2, 3]. Наиболее часто в CRISPRi используют следующие комбинации репрессорных факторов: dCas9, KRAB-dCas9 и dCas9-KRAB. Хотя процесс KRAB-dCas9 и sgPHK-опосредованного ноклауна CRISPRi не изучен досконально, можно предполагать, что его механизм такой же, как и в случае с эндонуклеазной системой CRISPR: сначала происходит экспрессия компонентов системы sgPHK и Cas9, затем образование комплекса sgPHK с белком Cas9, который транспортируется в ядро, где ищет мишень и после связывания с ней вносит двухцепочечный разрыв в ДНК [6]. Cas9 обеспечивает стабильность sgPHK, а уровень содержания комплексов Cas9 с sgPHK в ядре определяет эффективность редактирования генома. Следует ожидать, что подобные процессы происходят и при CRISPRi. Представляется важным установить, как уровни содержания репрессоров на основе dCas9 и sgPHK влияют на эффективность CRISPRi.

В исследовании для оценки эффективности CRISPRi использованы различные клоны клеток с различным уровнем белка KRAB-dCas9 и субклоны с различным уровнем экспрессии sgPHK. Для идентификации основного фактора, влияющего на эффективность CRISPRi, применен линейный регрессионный анализ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток и получение плазмид. Линии клеток НЕК-293Т и К562 приобретены у National Infrastructure of Cell Line Resource (Китай). Клетки НЕК-293Т культивировали при 37°С в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), содержащей 4.5 г/л глюкозы ("Gibco", США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; "Gibco"). Клетки К562 культивировали в модифицированной по Искову среде Дульбекко (IMDM; "Gibco") с добавлением 10% FBS. Клеточные культуры проверяли каждые 3 месяца на контаминацию микоплазмами и каждый раз получали отрицательный результат. Чтобы создать вектор с доксициклининдуцируемой экспрессией белка KRAB-dCas9, промотор в плазмиде SFFV-KRAB-dCas9 (плазмида #60954, "Addgene", США; любезно предоставлена Jonathan S. Weissman) заменили на промотор pTRE3G (плазмида #96964, "Addgene"; любезно предоставлена Elena Cattaneo) с помощью классического метода клонирования. Праймеры указаны в табл. S1 Приложения (см. Приложение на сайre http://www.molecbio.ru/downloads/2021/1/supp_Wang_rus.pdf).

Упаковка лентивирусных частиц. За 1 сутки до трансфекции во флаконы Т175 высевали 2.1 × 10⁷ клеток НЕК-293Т. Клетки трансфицировали упаковывающими плазмидами pSPAX2 (11.6 мкг) и pMD2.G (2.8 мкг) (#12260 и #12259 "Addgene" coответственно; любезно предоставлены Didier Trono) и целевыми плазмилами (11.6 мкг) с использованием полиэтиленимина (PEI; 1 мг/мл), имеющего соотношение азота к фосфору (N/P) 20 [2, 7]. Супернатанты, содержащие вирусные частицы, собирали через 48 и 72 ч после трансфекции и фильтровали с использованием 0.45-мкм фильтров. После этого на дно центрифужной пробирки, содержащей 32 мл вируссодержащего супернатанта, вносили 4 мл 20%-ного раствора сахарозы и проводили ультрацентрифугирование при 82700 × g и 4°C в течение 2 ч [8]. Осадок ресуспендировали в 100 мкл предварительно охлажденного PBS без Ca²⁺/Mg²⁺. Титр препарата лентивирусных частиц определяли методом проточной цитометрии, как описано ранее [8].

Клональная селекция после лентивирусной трансдукции. С целью получить единичные клоны с конститутивной экспрессией белка KRAB-dCas9 1 × × 10⁵ клеток K562 трансдуцировали лентивирусными частицами, содержащими SFFV-KRAB-dCas9, с использованием полибрена (конечная концентрация 10 мкг/мл) при MOI 20 в 6-луночных планшетах. Через 72 ч после трансдукции клетки анализировали и сортировали в 96-луночные планшеты с использованием сортировщика клеток BD FACSAria II ("BD Biosciences", США). Единичные клоны, появившиеся через 14 суток, культивировали для дальнейшего анализа.

Для получения единичных клонов с индуцибельной экспрессией KRAB-dCas9 1 \times 10⁵ клеток K562 инфицировали лентивирусными частицами, экспрессирующими трансактиватор промотора pTRE3G (pLVX-Tet3G). Трансдуцированные клетки растили в течение 10 суток в присутствии G418 (конечная концентрация 100 мкг/мл). Полученные клоны трансдуцировали лентивирусными частицами, содержащими pTRE3G-KRABdCas9, с использованием полибрена и выделяли отдельные клоны, как описано выше.

Проточная цитометрия. Проточную цитометрию проводили на приборе Beckman CytoFLEX S ("Beckman Coulter", США). Данные анализировали с использованием программного обеспечения Flowjo 10 и CytoExpert 2.0.

Иммуноблотинг и иммуноферментный анализ (ИФА). Для определения содержания белка КRAB-dCas9 клетки клона K562-idCas9 #49 индуцировали доксициклином в концентрациях 200 нМ и 2000 нМ в течение 48 ч. Общий белок выделяли в лизисном буфере RIPA с 1 мМ PMSF и определяли концентрацию с использованием BCA Protein Assay kit (#PC0020, "Solarbio Life Science", Китай). Для иммуноблотинга белковые лизаты (20 мкг) разделяли электрофорезом в 8%ном SDS-PAAG и переносили на нитроцеллюлозную мембрану 0.22 мкм при 150 В в течение 90 мин. Мембрану инкубировали сначала с поликлональными антителами против Cas9 (#632607, "Clontech Laboratories Inc.", США) и α-тубулина (#AC012, "ABclonal", США), а затем со вторичными антителами IRDveTM-800CW (Lot No. C50113-06, "BD Biosciences"). Мембрану сканировали с помощью системы визуализации OdysseyTM CLx ("Li-COR Bioscience", США). Содержание белка KRAB-dCas9 количественно определяли с использованием набора CRISPR/Cas9 для ИФА (#P-4060-48, "EpiGentek", США) в соответствии с протоколом производителя.

Оценка эффективности CRISPRi нокдауна. Одиночные клоны инфицировали лентивирусом, экспрессирующим sgPHK. (MOI 20. если не указано иное) с полибреном (конечная концентрация 10 мкг/мл). После 72-часовой трансдукции клоны отбирали пуромицином (конечная концентрация 5 мкг/мл) в течение 72 ч. Уровень экспрессии генов-мишеней определяли количественной ПЦР с использованием метода относительной количественной оценки. Праймеры для ПЦР указаны в табл. S1 Приложения (см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2021/1/supp Wang rus.pdf). В первую очередь специфичность праймеров проверяли путем анализа кривых плавления продуктов ПЦР и их разделения электрофорезом в агарозном геле. Далее определяли эффективность реакции ПЦР, анализируя серию разведений кДНК в качестве матрицы. Уровень экспрессии оценивали с помощью пакета программ, поставляемого с прибором LightCycler 96 ("Roche", Швейцария). Относительный уровень экспрессии целевого гена определяли путем деления на усредненный уровень мРНК GAPDH и β-актина, используемых в качестве референсных генов. Эффективность нокадуна рассчитывали по формуле:

$[1 - (MPHK_{II}/MPHK_{K})] \times 100\%$,

где мРНК_и — относительный уровень мРНК целевого гена в опыте; мРНК_к — относительный уровень мРНК в отрицательном контроле — клеточном клоне, не инфицированном лентивирусом.

Статистический анализ. Дисперсионный анализ (ANOVA) выполняли при сравнении данных, полученных от четырех клеточных клонов. Линейный регрессионный анализ выполняли с целью выявления взаимосвязи между эффективностью нокдауна и уровнем экспрессии либо KRAB-dCas9, либо sgPHK. Все статистические анализы проводили с использованием пакета программ SPSS.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью понять, какой из факторов: уровень белка KRAB-dCas9 или уровень sgPHK — оказывает наибольшее влияние на эффективность нокдауна CRISPRi, мы применили иерархическую схему экспериментов, согласно которой сначала сравнивали эффективность нокдауна в клонах с различным уровнем содержания белка KRABdCas9, а затем сравнивали эффективность нокдауна в субклонах клеток с различным уровнем экспрессии sgPHK (рис. 1*a*). В первой серии экспериментов получены клоны клеток K562 с конститутивной или индуцибельной экспрессией гена химерного белка KRAB-dCas9-mCherry.

Систему Tet-оп использовали при создании клеточных линий, экспрессия химерного белка KRAB-dCas9-mCherry в которых индуцировалась доксициклином: сначала с помощью лентивирусной транслукции и последующей селекцией G418 в клетки К562 ввели конструкцию, кодирующую транс-активатор (плазмида Tet3G) промотора pTRE3G, далее в эти клетки путем лентивирусной трансдукции ввели конструкцию, экспрессирующую KRAB-dCas9-mCherry под контролем индуцибельного промотора pTRE3G (рис. 16). Из двенадцати 96-луночных планшетов путем FACS с использованием mCherry в качестве репортерного белка случайным образом выбраны 60 клонов (K562-idCas9 от #1 до #60) для дальнейших экспериментов. Индукцию экспрессии трансгена определяли с помощью проточной цитометрии в присутствии доксициклина (рис. S1 и S2 Приложения, см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2021/1/supp Wang rus.pdf). На основании степени изменения уровня экспрессии трансгена, вычисленного как отношение средней интенсивности флуоресценции (MFI) клеток после индукции доксициклина к интенсивности без индукции доксициклином (индуцированный MFI/неиндуцированный MFI), провели ранжировку выбранных 60 клонов (рис. 1в) и для дальнейшего анализа выбрали 5 клонов (K562-idCas9 #9, #25, #49, #54, #60) с различной степенью изменения уровня экспрессии трансгена.

Сначала подтвердили индуцибельную экспрессию KRAB-dCas9-mCherry в K562-idCas9 #49 и #60 по содержанию mCherry, коэкспрессируемого с KRAB-dCas9, с помощью проточной цитометрии (рис. 2*a*). Далее детектировали dCas9 с помощью иммуноблоттинга и ИФА (рис. 2*6*, *в*). Белок KRAB-dCas9, как и ожидалось, в основном локализовался в ядре. Сигнал MFI mCherry соответствовал сигналу ИФА. Это значит, что mCherгу служит адекватным репортером уровня экс-



Рис. 1. Схемы лентивирусных конструкций и отбора клеточных клонов с индуцибельной экспрессией компонентов системы CRISPRi. Получение и селекция клонов с индуцируемой экспрессией dCas9. a - Cxema эксперимента. #B - K562-dCas9 #B; #C - K562-dCas9 #C; #49 - K562-idCas9 #49; #60 - K562-idCas9 #60. #B1, #B2, #B3, #B4 и #B5 обозначают субклоны клона K562-dCas9 #B, инфицированные лентивирусным вектором, несущим sgPHK, при различных MOI. δ - Схема лентивирусных векторов, кодирующих KRAB-dCas9 под контролем индуцибельных и конститутивных промоторов. a - 60 клонов с индуцибельной экспрессией dCas9 ранжированы по соотношению индуцированный MFI/неиндуцированный MFI, красными ромбиками отмечены отдельные клоны, использованные в дальнейшем анализе. Экспрессию индуцировали доксицилином в конечной концентрации 2 000 нМ в течение 48 ч.

прессии KRAB-dCas9. Для проведения CRISPRi экспериментов у компании "Addgene" были приобретены две библиотеки sgPHK: hCRISPRi-v2 [9] и Dolcetto [10]. Каждая библиотека содержит несколько sgPHK, нацеленных на интересующие нас гены. Ранжированные sgPHK представлены в табл. 1. Пилотные эксперименты по CRISPRi нокдауну проводили с использованием лентивирусных частиц, несущих sgPHK высшего ранга против UBE4A и DPH2 из библиотеки hCRISPRi-v2. K562-idCas9 #9, #25, #54 были исключены из дальнейшего анализа на основании низкой эффективности CRISPRi нокдауна в пилотных экспериментах (рис. S3*a*-г Приложения, см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2021/1/supр Wang rus.pdf). В клоне K562-idCas9 #49, обладающем относительно высоким уровнем экспрессии KRAB-dCas9-mCherry, эффективность нокдауна гена *DPH2* в присутствии 100 нМ доксициклина составила 24% (рис. S3∂ Приложения). Клоны K562-idCas9 #49, а также #60, который имеет относительно низкую экспрессию KRAB-dCas9-mCherry (рис. 2*г*), выбрали для дальнейшего анализа.

Аналогичным образом анализировали клоны клеток, конститутивно экспрессирующие KRABdCas9-mCherry, и выбрали три клона: K562-dCas9 #A, K562-dCas9 #B и K562-dCas9 #C. В пилотных экспериментах по нокдауну установлено, что в клоне K562-dCas9 #A нокдауна генов *UBE4A* и *DPH2* не наблюдается (рис. S3e Приложения, см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2021/1/ supp_Wang_rus.pdf), поэтому он был исключен из дальнейшего анализа.

sgPHK	Последовательность (5' \rightarrow 3')	Ранг	Библиотека	
DPH2	GATGTTTAGCAGCCCTGCCG	2/10	hCRISPRi-v2	
UBE4A	GACAGGGTCGAAGTTCAAGA	1/10	hCRISPRi-v2	
MMADHC	GAAAATACGGGCAATACCGA	1/10	hCRISPRi-v2	
RPIA	GGTGCACAGTCTGGGACCCG	1/10	hCRISPRi-v2	
ZNF148	GCAGGCCGAGCGCTTTACCG	1/10	hCRISPRi-v2	
LSM4	CAGTTGCCCTGCCCTCACCA	1/3	Dolcetto	
NPEPPS	TGGCGGGCGGGCTGCCTACG	3/3	Dolcetto	
LIMA1	GATGCTTTCTCCATGTGGCA	1/3	Dolcetto	

Таблица 1. Последовательности спейсеров sgPHK



Рис. 2. Оценка уровня KRAB-dCas9 в клеточных клонах с индуцибельной и конститутивной экспрессией соответствующего гена. a - MFI-сигнал mCherry в клонах K562-idCas9 #49 и K562-idCas9 #60 в ответ на различные концентрации доксициклина. Треугольниками обозначен клон K562-idCas9 #49, кружками – клон K562-idCas9 #60. δ , e - Результаты определения содержания KRAB-dCas9 в ядерной и цитоплазматической фракциях клеток методами иммуноблотинга и ИФА в клоне K562-idCas9 #49, обработанном доксициклином в конечной концентрации 200 нМ и 2 000 нМ. e - MFI-сигнал mCherry в двух клонах с конститутивной экспрессией dCas9 и в двух клонах с индуцибельной экспрессией dCas9 и в двух клонах с индуцибельной экспрессией dCas9 в в деркотической фракциях клеток методами иммуноблотинга и ИФА в клоне K562-idCas9 #49, обработанном доксициклином в конечной концентрации 200 нМ и 2 000 нМ. e - MFI-сигнал mCherry в двух клонах с конститутивной экспрессией dCas9 и в двух клонах с индуцибельной экспрессией dCas9 и в двух клонах с индуцибельной экспрессией dCas9 и в двух клонов: #B – K562-dCas9 #B; #C – K562-dCas9 #C; #49 – K562-idCas9 #49; #60 – K562-idCas9 #60.

Чтобы оценить влияние уровня экспрессии KRAB-dCas9 на эффективность нокдауна в CRISPRi-системе использовали клетки с конститутивной K562-dCas9 #В, #С и индуцибельной K562-idCas9 #49, #60 экспрессией KRAB-dCas9. В индуцибельных клонах уровни KRAB-dCas9 были ниже, чем в конститутивных клонах (рис. 2г). Для CRISPRi-экспериментов из каждой библиотеки случайным образом выбрали по три sgPHK против целевых генов с высоким рейтингом (табл. 1). После лентивирусной трансдукции sgPHK векторами проводили селекцию клонов клеток с помощью пуромицина и оценивали эффективность нокдауна методом количественной ПЦР. Наиболее эффективное подавление экспрессии генов mmadhc, rpia, znf148, lsm4 и lima1 наблюдали в клоне K562-dCas9 #В с наивысшим уровнем экспрессии KRAB-dCas9 (рис. 3a). В остальных клонах наблюдали относительно низкую эффективность нокдауна или его отсутствие, что выражалось в относительно высоком уровне экспрессии целевого гена (рис. 3а). Эти данные указывают на то, что высокий уровень экспрессии KRAB-dCas9 — важное условие эффективного процесса CRISPRi.

Для оценки статистической значимости различий между четырьмя клеточными клонами использовали ANOVA. Установлено, что K562dCas9 #В значимо отличался от K562-dCas9 #C и K562-idCas9 #60, а *p*-value при сравнении K562dCas9 #В и K562-idCas9 #49 составляло 0.054, из чего можно сделать вывод, что K562-dCas9 #B отличается также и от K562-idCas9 #49. Это еще раз подтверждает наш вывод о том, что K562dCas9 #В работает как эффективный компонент CRISPRi-системы (табл. 2).

Мы проанализировали также, влияет ли уровень экспрессии целевого гена на эффективность нокдауна, и не обнаружили значимой корреляции (рис. 36). Относительный уровень экспрессии генов-мишеней в четырех клеточных клонах отличался друг от друга, вероятно, как следствие процедуры клонирования [11] (рис. 36). Непрерывный мониторинг уровня экспрессии KRABdCas9 показал, что K562-dCas9 #С теряет экспрессию трансгена с течением времени, тогда как



Рис. 3. Для эффективного нокдауна CRISPRi необходим достаточный уровень KRAB-dCas9. *a* – Эффективность нокдауна 6 генов в четырех клонах. Обозначения клонов: #B – K562-dCas9 #B; #C – K562-dCas9 #C; #49 – K562-idCas9 #49; #60 – K562-idCas9 #60. *б* – Влияние уровня экспрессии целевого гена на эффективность CRISPRi нокдауна в клоне K562-dCas9 #B. *в* – Относительный уровень экспрессии 6 целевых генов в четырех клонах. Обозначения клонов, как на виде (*a*).

в других клонах этого не происходило (табл. S2 Приложения).

Используя клон K562-dCas9 #В, мы оценили влияние уровня экспрессии sgPHK на эффективность нокдауна. Перед выполнением основных экспериментов подобрали условия переноса трансгена, обеспечивающие наибольшую эффективность трансдукции клеток, путем измерения MFI синего флуоресцентного белка (BFP), коэкспрессируемого с sgPHK в полицистронном транскрипте. Согласно полученным данным, значения MFI BFP коррелировали с MOI и соответствовали полиномиальной кривой (рис. 4*a*). По результатам анализа этой кривой скорость переноса трансгена составила 34.1% при MOI 0.5, что близко к ранее сообщавшейся скорости переноса гена: 28.6% при MOI 0.5 в клетках К562 [12]. Эти данные подтверждают эффективную упаковку лентивируса и трансдукцию.

Затем с использованием проточной цитометрии подтвердили положительную корреляцию MOI с уровнем экспрессии sgPHK (рис. 46). Обнаружили линейную корреляцию BFP MFI с MOI (рис. 48). Более того, наблюдали линейную зависимость между MOI и эффективностью нокдауна (рис. 42), из чего следует, что уровень экспрессии sgPHK положительно коррелирует с эффективностью нокдауна. На примере гена *mmadhc* показано, что при MOI 0.5, обычно используемом при скрининге библиотек CRISPRi, может быть достигнута эффективностью нокдауна около 45% (рис. 42).

Клеточный клон	Средняя эффективность нокдауна (%)	Стандартное отклонение (%)			
K562-dCas9 #B	43.16 ^a	45.55			
K562-idCas9 #49	-3.24 ^{ab}	48.65			
K562-dCas9 #C	-4.63 ^b	36.48			
K562-idCas9 #60	-15.24 ^b	19.92			

Таблица 2. Эффективность нокдауна в четырех клеточных клонах

^{a, ab, b}Отдельно указана статистическая значимость эффективности нокдауна (p < 0.05). ^a – Обозначает сравнение между #B и #49, ^b – обозначает сравнение между #49, #C и #60.



Рис. 4. Эффективность CRISPRi нокдауна коррелирует с уровнем экспрессии sgPHK. *a* – Зависимость эффективности переноса sgPHK против гена *mmadhc* от MOI, определенная по MFI-сигналу BFP в клоне K562-dCas9 #B. *б* – Диаграмма рассеяния для клона K562-dCas9 #B, экспрессирующего sgPHK против гена *mmadhc*. Красной рамкой выделена область клеток с положительным сигналом флуоресценции BFP. *в* – Зависимость MFI-сигнала BFP в клетках, экспрессирующих sgPHK, от MOI лентивируса, несущего sgPHK против гена *mmadhc*, в клоне K562-dCas9 #B. Клетки, экспрессирующие sgPHK, детектировали с помощью проточной цитофлуориметрии. *г* – Зависимость эффективности нокдауна от MOI лентивируса, кодирующего sgPHK против гена *mmadhc*, в клоне K562-dCas9 #B.

С целью оценить индивидуальный вклад уровней экспрессии dCas9 и sgPHK в эффективность нокдауна использовали модель линейной регрессии с MFI dCas9 и sgPHK в качестве независимых переменных. Подтверждено, что соблюдается условие равной дисперсии у сравниваемых групп данных. Согласно полученным данным, когда dCas9 служит независимой переменной в линейной модели, $R^2 = 0.243$, F = 8.367, p = 0.008, a значит уровень содержания dCas9 значимо влияет на эффективность нокдауна. По значению стандартизованного коэффициента, $\beta_1 = 0.525$, можно сделать вывод о том, что при изменении уровня dCas9 на единицу стандартного отклонения эффективность нокдауна изменится на 0.525 стандартного отклонения. Результаты аналогичных расчетов, выполненных для sgPHK в качестве независимой переменной в линейной модели, следующие: $R^2 = 0.949$, F = 75.84, p = 0.003 и стандартизованный коэффициент $\beta_2 = 0.981$. Это значит, что уровень sgPHK тоже сильно влияет на эффективность нокдауна, и изменение уровня sgPHK на единицу стандартного отклонения соответствует изменению эффективности нокдауна на 0.981 стандартного отклонения. Таким образом, на основании значений стандартизованного коэффициента $\beta 2$ можно сделать вывод о том, что уровень sgPHK оказывает бо́льшее влияние на эффективность нокдауна, чем уровень dCas9.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапа исследований динамики процесса CRISPRi, опосредованного искусственным репрессором KRAB-dCas9, мы оценили влияние уровней химерного белка на основе dCas9 и sgPHK на эффективность нокдауна. Полученные данные могут служить основой для дальнейшей оптимизации скрининга библиотек CRISPRi.

Обнаружено, что уровень экспрессии KRABdCas9 значительно влияет на эффективность CRISPRi-системы. На основании полученных результатов, несмотря на ограниченное число проверенных клонов, можно полагать, что для эффективного нокдауна необходим определенный уровень химерного белка dCas9. Безусловно, только после проведения дополнительных исследований на большем числе клеточных клонов можно выяснить, действительно ли существует пороговый уровень содержания KRAB-dCas9, выше которого гарантирован эффективный нокдаун.

Требование по определенному уровню KRABdCas9 имеет большое значение при скрининге библиотек CRISPRi. Дело в том, что после лентивирусной инфекции обязательно проводят отбор клеток, а проблема состоит в том, что их требуется много, так как число клеток в каждой группе должно тысячекратно превышать количество sgPHK в используемой библиотеке. Именно поэтому при работе с библиотеками большого размера требуется высокоскоростной сортировщик клеток, который, к сожалению, недоступен в большинстве лабораторий. В отсутствие подобного инструмента скрининг библиотеки CRISPRi следует проводить в клеточных клонах, обеспечивающих стабильный и высокий уровень содержания KRAB-dCas9. Однако промотор интегрированного лентивирусного вектора может метилироваться, что приводит к выключению экспрессии трансгена при непрерывном культивировании клеточных линий, что, по-видимому, произошло в одном из клеточных клонов – K562-dCas9 #C. На основании вышеизложенного имеет смыл вести непрерывный мониторинг уровня KRAB-dCas9 и использовать в эксперименте несколько клонов.

Известно, что в отдельных изолированных клонах изменен транскрипционный паттерн клеток, экспрессирующих KRAB-dCas9, поэтому CRISPRi стоит проводить в поликлональных популяциях клеток [11]. Однако влияние изменения паттерна транскрипции, как следствие процедуры клеточного клонирования, можно нивелировать использованием одного и того же клона в дальнейших исследованиях. Помимо использования клонов с высоким уровнем содержания химерного белка dCas9 мощность скрининга CRISPRi можно увеличить за счет постоянной селекции клеток в присутствии антибиотиков - при условии наличия гена устойчивости к ним в используемых трансгенных конструкциях. Альтернативой может быть использование более эффективного химерного репрессора dCas9-KRAB-MeCP2 [13].

Из шести генов, случайно выбранных для CRISPRi, эффективность репрессии *преррs* и *rpia* была самой низкой в большинстве или во всех клонах. Согласно аннотации, экспрессия гена *преррs* чувствительна к пуромицину, поэтому вполне вероятно, что при селекции sgPHK трансдуцированных клонов в присутствии пуромицина произошла активация его экспрессии. В случае *rpia* также есть сообщения о сверхэкспрессии этого гена в ответ на обработку доксициклином [14]. Нами обнаружено, что при высоком уровне содержания KRAB-dCas9 эффективность CRISPRi хорошо коррелирует с MOI. В то же время эффективность CRISPRi хорошо коррелировала и с экспрессией sgPHK. Несмотря на отсутствие данных, мы предполагаем, что в CRISPRi, как и в случае системы CRISPR, накопление направляющей PHK в ядре служит ограничивающим фактором для эффективного действия эффектора Cas9 [6, 15]. Нами обнаружено, что уровень sgPHK в большей степени влияет на эффективность CRISPRi, чем уровень dCas9. Логично предположить, что динамика образования рибонуклеопротеидных комплексов и поиска мишени на ДНК сходна в системах CRISPR и CRISPRi.

Для повышения эффективности нокдауна критически важно достигать высокого уровеня экспрессии sgPHK, учитывая ее нестабильность в свободном состоянии — когда она не связана с белком Cas9 [6]. Действительно, увеличение стабильности sgPHK повышает эффективность ДНК-интерференции [16]. Использование сильного промотора также должно способствовать увеличению уровня sgPHK.

Корреляция между уровнем экспрессии sgPHK и эффективностью нокдауна в системе CRISPRi может быть использована для скрининга библиотек CRISPRi, причем индуцибельная экспрессия sgPHK позволит лучше контролировать эффективность нокдауна. Это же сообщалось для системы CRISPR, где на платформе индуцибельной sgPHK удается проводить эффективный контроль нокдауна [17], что опять же указывает на сходство между двумя системами: CRISPR и CRISPRi.

Авторы выражают благодарность проф. Jonathan S. Weissman, David E. Root и John G. Doench за любезно предоставленную через "Addgene" библиотеку CRISPRi, а также д-ру Luke A. Gilbert за советы по использованию библиотеки CRISPRi.

Работа выполнена при финансовой поддержке National Natural Science Foundation of China (81860652).

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evers B., Jastrzebski K., Heijmans J., Grernrum W., Beijersbergen R.L., Bernards R. (2016) CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. *Nat. Biotechnol.* 34, 631–633.
- 2. Gilbert L.A., Horlbeck M.A., Adamson B., Villalta J.E., Chen Y.W., Whitehead E.H., Guimaraes C.P., Panning B.,

Ploegh H.L., Bassik M.C., Qi L.S., Kampmann M., Weissman J.S. (2014) Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell.* **159**, 647–661.

- Yeo N.C., Chavez A., Lancebyrne A., Chan Y.C., Menn D.J., Milanova D., Kuo C.C., Guo X.G., Sharma S., Tung A., Cecchi R.J., Tuttle M., Pradhan S., Lim E.T., Davidsohn N., Ebrahimkhani M.R., Collins J.J., Lewis N.E., Kiani S., Church G.M. (2018) An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. *Nat. Methods.* 15, 611–616.
- Peng H.Z., Ivanov A.V., Oh H.J., Lau Y.C., Rauscher F.J. (2009) Epigenetic gene silencing by the SRY protein is mediated by a KRAB-O protein that recruits the KAP1 co-repressor machinery. *J. Biol. Chem.* 284, 35670–35680.
- 5. Hansen J.C., Ghosh R.P., Woodcock C.L. (2010) Binding of the Rett syndrome protein, MeCP2, to methylated and unmethylated DNA and chromatin. *IUBMB Life*. **62**, 732–738.
- Ma H.H., Tu L.C., Naseri A., Huisman M., Zhang S.J., Grunwald D., Pederson T. (2016) CRISPR-Cas9 nuclear dynamics and target recognition in living cells. *J. Cell Biol.* 214, 529–537.
- Yang S.Z., Shi H.J., Chu X.R., Zhou X.L., Sun P.N. (2016) A rapid and efficient polyethyleneimine-based transfection method to prepare lentiviral or retroviral vectors: useful for making iPS cells and transduction of primary cells. *Biotechnol. Lett.* 38, 1631–1641.
- Kutner R.H., Zhang X.Y., Reiser J. (2009) Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1based lentiviral vectors. *Nat. Protoc.* 4, 495–505.
- Horlbeck M.A., Gilbert L.A., Villalta J.E., Adamson B.S., Pak R.A., Chen Y.W., Fields A.P., Park C.Y., Corn J.E., Kampmann M., Weissman J.S. (2016) Compact and highly active next-generation libraries for CRISPR-mediated gene repression and activation. *Elife.* 5, e19760.
- 10. Sanson K.R., Hanna R.E., Hegde M., Donovan K.F., Strand C., Sullender M.E., Vaimberg E.W., Goodale A.,

Root D.E., Piccioni F., Doench J.G. (2018) Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities. *Nat. Commun.* **9**, 5416.

- Stojic L., Lun A.T., Mangei J., Mascalchi P., Quarantotti V., Barr A.R., Bakal C., Marioni J.C., Gergely F., Odom D.T. (2018) Specificity of RNAi, LNA and CRISPRi as loss-of-function methods in transcriptional analysis. *Nucleic Acids Res.* 46, 5950–5966.
- Kustikova O.S., Wahlers A., Kuhlcke K., Stahle B., Zander A.R., Baum C., Fehse B. (2003) Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood*. **102**, 3934–3937.
- Martella A., Firth M., Taylor B.J., Goppert A., Cuomo E.M., Roth R.G., Dickson A.J., Fisher D.I. (2019) Systematic evaluation of CRISPRa and CRISPRi modalities enables development of a multiplexed, orthogonal gene activation and repression system. *ACS Synth. Biol.* 8, 1998–2006.
- Ahler E., Sullivan W.J., Cass A., Braas D., York A.G., Bensinger S.J., Graeber T.G., Christofk H.R. (2013) Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines. *PLoS One.* 8, e64561.
- Yuen G., Khan F.J., Gao S.J., Stommel J.M., Batchelor E., Wu X.L., Luo J. (2017) CRISPR/Cas9-mediated gene knockout is insensitive to target copy number but is dependent on guide RNA potency and Cas9/sgRNA threshold expression level. *Nucleic Acids Res.* 45, 12039–12053.
- Mu W., Zhang Y.P., Xue X.T., Liu L., Wei X.F., Wang H.Y. (2019) 5' capped and 3' polyA-tailed sgRNAs enhance the efficiency of CRISPR-Cas9 system. *Protein Cell*. 10, 223–228.
- Aubrey B.J., Kelly G.L., Kueh A.J., Brennan M.S., Oconnor L., Milla L., Wilcox S., Tai L., Strasser A., Herold M.J. (2015) An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations *in vivo. Cell Rep.* 10, 1422–1432.

LEVELS OF sgRNA AS A MAJOR FACTOR AFFECTING CRISPRI KNOCKDOWN EFFICIENCY IN K562 CELLS

Y. Wang¹, Y. Xie², Z. C. Dong¹, X. J. Jiang¹, P. Gong¹, J. Lu¹, and F. Wan^{1, *}

¹College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia, 010010 China ²College of Science, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia, 010010 China *e-mail: fwan@imau.edu.cn

To determine how nuclease deactivated Cas9 (dCas9) or sgRNA expression levels affect the knockdown efficiency of CRISPRi, we created K562 cell clones expressing KRAB-dCas9 protein either with the inducible Tet-on system or with the constitutive SFFV promotor. Single clones were selected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) for further study. Six genes with various expression levels were targeted using lentiviral sgRNA from two libraries in four cell clones with various KRAB-dCas9 expression levels. The expression level of dCas9 protein/sgRNA levels and the knockdown efficiency were determined by flow cytometry. The cell clone with the highest KRAB-dCas9 expression level achieved effective CRISPRi knockdown. The data describing this clone were statistically different from that on other clones, indicating the strong KRAB-dCas9 expression might be a prerequisite for CRISPRi. By adopting different multiplicity of infection(MOI) in lentiviral transduction of this clone, we modified the expression level of sgRNA and found that the knockdown

ЭФФЕКТИВНОСТЬ CRISPRi НОКДАУНА

efficiency was neither affected by the target gene expression level nor correlated with KRAB-dCas9 levels, which remained relatively constant across all knockdown experiments (coefficient of variation =2.2%). As an example, the following levels of the knockdowns: 74.72, 72.28 and 39.08% for *mmadhc*, *rpia* and *znf148* genes, respectively, were achieved. These knockdown efficiencies correlated well with the respective sgRNA expression levels. Linear regression models built using this data indicate that the knockdown efficiency may be significantly affected by the levels of both KRAB-dCas9 and sgRNA. Notably, the sgRNA levels have greater impact, being a major factor affecting CRISPRi efficiency.

Keywords: CRISPR interference, knockdown, inducible Tet-on system, multiplicity of infection, sgRNA

УЛК 578.274.8:57.083.22

БЕТАСАТЕЛЛИТ КУРЧАВОСТИ ЛИСТЬЕВ ХЛОПКА МУЛЬТАНА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ ГЕМИНИВИРУСОВ В РАСТЕНИЯХ¹

© 2021 г. Z. Igbal^{a, *, **}, M. N. Sattar^b, M. Khurshid^c

^aCentral Laboratories, King Faisal University, Al-Ahsa, 31982 Kingdom of Saudi Arabia ^bDepartment of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Food Sciences, King Faisal University, Al-Ahsa, 31982 Kingdom of Saudi Arabia ^cInstitute of Biochemistry and Biotechnology, University of the Punjab, Quaid-e-Azam Campus, Lahore, 54590 Pakistan

*e-mail: zafar@kfu.edu.sa **e-mail: zafariqbal2009@gmail.com Поступила в редакцию 11.03.2020 г. После доработки 30.04.2020 г. Принята к публикации 27.05.2020 г.

Бетасателлит курчавости листьев хлопка Мультана (CLCuMB) – распространенный бетасателлит, который обычно встречается вместе с бегомовирусами, ассоциированными с заболеванием курчавости листьев хлопка (CLCuD), в Старом Свете. Этот бетасателлит имеет малоизбирательный характер репликации и транс-реплицируется широким кругом геминивирусов. Бетасателлит CLCuMB кодирует единственную открытую рамку считывания (ORF) β C1, расположенную в комплементарном направлении, продукт которой определяет патогенность, выраженность симптомов и подавляет посттранскрипционный и транскрипционный сайленсинг генов. Бетасателлит успешно используют в качестве вектора для доставки генов путем замены гена βС1 на целевой ген. В представленной работе для замены гена $\beta C1$ на ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) использован этот же подход и рассмотрено возможное применение полученного конструкта в качестве репортерного вектора, позволяющего изучать локализацию геминивирусов in planta. С этой целью рекомбинантный СLCuMB, продуцирующий GFP (CLCuMB-GFP), был использован для совместного заражения растений Nicotiana benthamiana либо только вирусом курчавости листьев хлопка Koxpaнa (cotton leaf curl Kokharan virus, CLCuKoV), либо в комбинации с бетасателлитом CLCuMB дикого типа. Показано, что CLCuKoV поддерживал репликацию и системное распространение CLCuMB-GFP как сам по себе, так и в сочетании с СLCuMB дикого типа. Наличие CLCuMB-GFP было четко показано методами ПЦР и Саузерн-блотинга. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что модифицированный бетасателлит CLCuMB может быть использован как удобный инструмент для изучения локализации геминивирусов in planta.

Ключевые слова: клеточная локализация, CLCuKoV, CLCuMB, экспрессионный вектор, зеленый флуоресцентный белок

DOI: 10.31857/S0026898421010079

ВВЕДЕНИЕ

Бетасателлиты (род Betasatellite, семейство Tolecusatellitidae) — это кольцевые одноцепочечные сателлиты, геном которых представлен молекулой ДНК длиной около 1.3 т.н. Бетасателлиты часто ассоциированы с геминивирусами (особенно с бегомовирусами). Впервые бетасателлиты описаны в 1999 году [1], а к настоящему времени

охарактеризован 61 вид и около 1 300 их полноразмерных изолятов из 37 стран (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/) [2]. Бетасателлиты не относятся к типичным сателлитным ДНК-вирусам и используют вирус-помошник для распространения, размножения и упаковки [3]. Все функции бетасателлитов реализованы в единственной комплементарной открытой рамке считывания

¹ Текст представлен авторами на английском языке.

Сокращения: CLCuKoV (cotton leaf curl Kokharan virus) – вирус курчавости листьев хлопка Koxpaнa; CLCuMB (cotton leaf curl Multan betasatellite) – бетасателлит курчавости листьев хлопка Мультана: $C\beta^{\beta C1-/GFP+}$ – рекомбинантный вектор CLCuMB-GFP; GFP (green fluorescent protein) – зеленый флуоресцентный белок; Ко – ДНК CLCuKoV; Сβ – ДНК CLCuMB; п.о. – пары оснований.



Рис. 1. Организация генома и примерный размер молекул CLCuMB и CLCuMB-GFP. Молекула CLCuMB кодирует ген единственного продукта, β Cl, в комплементарном направлении, который заменили на ген белка GFP (*gfp*) с получением конструкции CLCuMB-GFP. Сайты рестрикции (Smal и HindIII) для замены гена β Cl на ген *gfp* введены с помощью специального набора праймеров. SCR – консервативная область сателлитов; A-гich – обогащенная по аденину область.

(ORF), кодирующей продукт β C1 (рис. 1), который способствует повышенному накоплению вируса-помощника в растениях [4, 5], проявлению симптомов [1, 4, 6] и подавлению транскрипционного и посттранскрипционного сайленсинга генов в ответе растения-хозяина [7]. Белок ВС1 локализован по периферии клетки и в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), предположительно участвуя в передвижении вируса [8]. Он также регулирует уровни микроРНК, что играет роль в процессах развития [9], связывается с ДНК и РНК [10], взаимодействует с факторами растения-хозяина [11], подавляет выработку жасмоновой кислоты [12], взаимодействует с белком PsbP, нарушая противовирусный ответ хозяина [13], а также взаимодействует с белком snRK1 [14].

Бетасателлит курчавости листьев хлопка Мультана (cotton leaf curl Multan betasatellite, CLCuMB) – единственный из бетасателлитов, часто встречающийся в Азии при заболевании курчавости листьев хлопка (cotton leaf curl disease, CLCuD), ассоциированном с бегомовирусом. CLCuMB транс-реплицируется с разнообразными геминивирусами, в том числе с вирусом курчавости листьев капусты (cabbage leaf curl virus, CabLCV) [15], вирусом курчавости листьев хлопка Кохрана (cotton leaf curl Kokharan virus, CLCuKoV) [5], вирусом курчавости листьев хлопка Гезиры (cotton leaf curl Gezira virus, CLCuGeV) [16], вирусом курчавости листьев хлопка Мультана (cotton leaf curl Multan virus, CLCuMuV), вирусом желтой курчавости листьев томата (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV), вирусом желтой скрученности бамии (okra vellow crinkle virus, OYCrV) [17], вирусом курчавости томата Бангалора (tomato leaf curl Bangalore virus, ToLCBaV) [18], вирусом деформирующей курчавости листьев бамии (okra enation leaf curl virus, OELCuV) [19], вирусом курчавости листьев томата (tomato leaf curl virus, ToLCV) [20, 21], вирусом курчавости верхушки свеклы (beet curly top virus, BCTV) [22], вирусом курчавости листьев томата Нью-Дели (tomato leaf curl New Delhi virus, ToLCNDV) [23, 24] и вирусом хлоротической карликовости нута (chickpea chlorotic dwarf virus, CpCDV) [25]. Кодируемый хелперным вирусом белок Rep обеспечивает транс-репликацию бетасателлита после связывания с 9-нуклеотидной последовательностью ТААТАТТАС, которая является единственной гомологичной последовательностью, обшей для бетасателлита и вирусапомощника [26]. Малоизбирательный характер репликации CLCuMB разнообразными геминивирусами указывает на то, что бетасателлит соответствует "гипотезе универсального итерона" и имеет уникальную последовательность, которая имитирует последовательности итеронов и допускает связывание с Rep [27]. Эта способность CLCuMB позволяет считать его чрезвычайно полезным инструментом в молекулярной биологии, который можно использовать в качестве экспрессионного вектора для изучения локализации белков *in planta*. К настоящему времени бетасателлит CLCuMB уже успешно модифицируют для продукции генов животных в растениях и для индуцированного вирусами сайленсинга генов путем замены ORF гена *βС1* на целевой ген [22, 28, 29].

Бегомовирусы (род *Begomovirus*, семейство Geminiviridae) представляют серьезную угрозу для двудольных растений, как для травянистых, так и для деревьев. Бегомовирусы переносятся белокрылкой; их геном, либо представленный одной молекулой (и тогда называемый монопартитным), либо состоящий из двух компонентов (и называемый бипартитным), упакован в капсид сдвоенной формы и представлен одноцепочечной молекулой ДНК размером около 2800 нуклеотидов [30]. Ассоциированные с вирусами одноцепочечные молекулы ДНК-сателлитов были обнаружены для подавляющего большинства монопартитных бегомовирусов и лишь для некоторых бипартитных бегомовирусов и мастревирусов (род Mastrevirus). К настоящему времени для геминивирусных инфекций охарактеризованы три различных типа одноцепочечных ДНК-сателлитных молекул: альфасателлиты, бетасателлиты и дельтасателлиты (обнаруживаемые как по отдельности, так и в различных комбинациях) [25, 31, 32].

Понимание и изучение роли бетасателлитов стало важной областью исследований в вирусологии растений за последние два десятилетия. Видоизменение и использование векторов на основе вирусов растений стало многообещающим инструментом молекулярной биологии для экспрессии целевых генов в растениях. Вирусные векторы уже широко используются при продукции полезных белков в коммерческих масштабах, при доставке генетического материала, в генной инженерии, генной терапии и в производстве вакцин [33–35].

В представленной работе ORF гена β*C1* бетасателлита CLCuMB мы заменили на ген *gfp* для изучения клеточной и субклеточной локализации вируса CLCuKoV в присутствии и в отсутствие бетасателлита CLCuMB дикого типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Продукция инфекционных клонов. Геном CLCuMB (регистрационный номер #AJ298903) был использован для замены гена $\beta C1$ на ген gfp без нарушения рамки считывания. Для создания рекомбинантного бетасателлита CLCuMB, экспрессирующего белок GFP (CLCuMB-GFP), был разработан специальный набор праймеров к фланкирующей области гена βC1, которые содержали сайт для эндонуклеазы HindIII в прямом праймере и сайты HindIII и SmaI в обратном (табл. 1). Продукт, полученный с использованием этих праймеров, клонировали в вектор pTZ57R/T, используя набор InsTAclone PCR cloning kit ("Thermo Fisher Scientific, Inc.", США), секвенировали, обрабатывали эндонуклеазой рестрикции HindIII, очищали электрофоретически, лигировали для получения кольцевой молекулы и, наконец, использовали в качестве матрицы для амплификации остова CLCuMB (несущего введенные сайты рестрикции) с праймерами $\beta 01/$ ВО2 [36]. Продукт амплификации клонировали в вектор pTZ57R/T с получением конструкции рТZCβ^{βC1-}. Область с частичными повторами ллиной около 200 п.о. (включающая ориджин репликации), полученную из плазмиды рТZС $\beta^{\beta C1-}$, клонировали в бинарный вектор рGreen0029 по сайтам BamHI и KpnI. Затем фрагмент длиной около 1000 п.о., полученный из рТZС $\beta^{\beta C1-}$, встраивали по сайтам KpnI с получением тандемных повторов (pGNC $\beta^{\beta C1-1.2}$). Ген белка GFP (фрагмент около 700 п.о.), обладающего сильным флуоресцентным сигналом [37], амплифицировали с использованием специфичных праймеров (табл. 1) и клонировали в вектор pGNC $\beta^{\beta C1-1.2}$ по сайтам HindIII и SmaI с получением конструкции С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ (рис. 1). Инфекционные клоны CLCuKoV (регистрационный номер # AJ496286) и CLCuMB описаны ранее [38].

Инфильтрация растений Nicotiana benthamiana. Все конструкции в бинарных векторах использовали для трансформации агробактерий Agrobacterium tumifaciens (штамм LBA 4404) и инфильтрации растений N. benthamiana на 06-08 стадии развития листьев, как описано ранее [39]. Растения выдерживали в климатической камере при отсутствии насекомых [5]. Растения ежедневно осматривали, проводили фотосъемку и регистрацию симптомов на 20 сутки после инокуляции (dpi). Продукцию белка GFP в обработанных растениях анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа LAS AF ("Leica", Германия). Образцы листьев отбирали на 25 dpi для выделения геномной ДНК, чтобы определить наличие введенных вирусных компонентов с помощью ПЦР и Саузерн-блотинга.

Анализ инфекционности CLCuKoV методами ПЦР и гибридизации Саузерн-блот. Выделенные экстракты геномов [40] анализировали методами диагностической ПЦР и гибридизации Саузерн-блот. Для определения ДНК CLCuKoV (Ko), CLCuMB (С β) и CLCuMB-GFP (С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$) были использованы праймеры к гену белка оболочки CP (CLCKCP35sF/CLCKCP35sR), праймеры

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность 5' \rightarrow 3'	Примечание ^а
CLCK CP 35sF CLCK CP 35sR	GGTCGACGAATTATGTCGAAGCGACCAG GGATCCAATTCAATATCTATTAATTTGTCACG	Амплификация <i>CP</i> CLCuKoV
BETA GFP F BETA GFP R	GATAAGCTTATGAGTAAAGGAGAAG GGCCCGGGTTATTTGTATAGTTCATC	Клонирование и детекция gfp
BetaC1 F BetaC1 R	ATAAATCGATATGACAACGAGCGGAACAAA TGTTCCCGGGTTAAACGGTGAACTTTTATT	Детекция <i>С</i> β
CBBF CBBR	TCGGAAGCTTTTCTGCTTATTTGATGGAAATG ATAAAAGCTTCACCCCCGGGATTCCAAACAC AAACCAGCAATGCAT	Амплификация остова <i>С</i> β (без β <i>С1</i>)
β01 β02	GGTACCACTACGCTACGCAGCAGCC GGTACCTACCCTCCCAGGGGTACA	Детекция и амплификация <i>С</i> β

^а Сокращения: $C\beta$ – геном CLCuMB; CP – ген белка оболочки; gfp – ген GFP.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021



Рис. 2. Фенотип растений *N. benthamiana*, инокулированных вирусом CLCuKoV и конструкцией CLCuMB-GFP, в отсутствие и в присутствии бетасателлита CLCuMB. Необработанные (здоровые; *a*) и обработанные контрольным раствором (δ), инокулированные Ко (e), Ко и С β (c), Ко и С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ (d) или Ко, С β и С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ (e). Растения сфотографированы на 25 сутки после инокуляции (dpi).

β01/β02 и праймеры ВЕТА GFP F/R (табл. 1) соответственно. Наблюдаемое *in vivo* наличие GFP в случае Сβ^{βC1-/GFP+} было подтверждено как в обработанных, так и в системно пораженных листьях с использованием праймеров, специфичных к гену *gfp* (BETA GFP F/R; табл. 1). Для детекции Ко, Сβ и Сβ^{βC1-/GFP+} была использована гибридизация Саузерн-блот, как описано ранее [5]. ДНК GFP детектировали с помощью амплифицированного методом ПЦР радиоактивно меченного зонда к гену *gfp*, содержащего α-[³²P]dCTP. Для детектирования сигнала гибридизации использовали прибор Phosphor imager (Personal Molecular Imager FX; "Bio-Rad", США).

Визуализация GFP. Продукцию белка GFP в обработанных растениях *N. benthamiana* сначала анализировали с помощью ручной УФ-лампы, а затем использовали флуоресцентный микроскоп

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

LAS AF ("Leica") для наблюдения за флуоресценцией в обработанных и системно заразившихся листьях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ инфекционности и симптомов, ассоциированных с вирусом CLCuKoV, в отсутствие или в присутствии бетасателлита CLCuMB

Заражение вирусом CLCuKoV (ДНК-конструкция Ко) методом агробактериальной инфильтрации вызывало скручивание листьев и утолщение жилок у растений *N. benthamiana* на 12 dpi (рис. 2, табл. 2). Впоследствии степень выраженности фенотипа, ассоциированного с заражением, усиливалась и рост этих растений замедлялся по сравнению с необработанными (рис. 2). Наличие инфекции подтверждено с помощью как ПЦР, так и гибридизации Саузерн-блот (рис. 3*a*).

У растений *N. benthamiana*, обработанных одновременно ДНК-конструкциями Ко и С β , латентный период сокращался до 10 суток, а заражение выражалось в закручивании листьев книзу, задержке роста и утолщении жилок (рис. 2, табл. 2). У этих растений выраженность симптомов нарастала с течением времени и развивался хлороз (пожелтение листовых пластинок), чего не наблюдалось в случае обработки растений только конструкцией Ко (рис. 2). Методом гибридизации Саузерн-блот в листьях растений выявлены как Ко, так и С β , при этом уровень Ко был выше, чем в растениях, обработанных только Ко (рис. 3*a*, *б*).

Анализ инфекционности и симптомов, ассоциированных с вирусом CLCuKoV, в присутствии CLCuMB-GFP

Совместная обработка Ко и СВ^{βC1-/GFP+} приводила к ослаблению фенотипических проявлений по сравнению с растениями, обработанными только конструкцией Ко. У всех обработанных растений *N. benthamiana* на 12 dpi проявлялся фенотип некоторой скрученности листьев и утолщения жилок (рис. 2, табл. 2). Диагностика методом ПЦР показала, что Ко успешно транс-реплицирует бетасателлитную конструкцию СВ^{βC1-/GFP+} и формирует жизнеспособный комплекс (хотя ген $\beta C1$ отсутствует), причем обе конструкции обнаружены во вновь появляющихся системно зараженных листьях (табл. 2). Методом Саузернблотинга показано, что накопление Ко в этом случае сравнимо с таковым для растений, инокулированных только Ко (рис. 3а, в). Хотя конструкт СВ^{βС1-/GFP+} достоверно детектировали методом ПЦР, по данным Саузер-блотинга уровень $C\beta^{\beta C1-/GFP+}$ был очень низким (рис. 3*в*).

Анализ инфекционности и симптомов, ассоциированных с CLCuKoV, в присутствии CLCuMB и CLCuMB-GFP

По сравнению с растениями, обработанными Ко и С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$, у растений *N. benthamiana*, инокулированных одновременно Ко, СВ и СВ^{βС1-/GFP+}. были более выражены следующие симптомы: закручивание листьев книзу, уменьшение размера листьев и утолщение жилок (рис. 2, табл. 2). По сравнению же с растениями, обработанными только Ко, в присутствии СВ сокращался латентный период (который составлял 10 суток), а степень выраженности симптомов усиливалась вплоть до начала цветения и развивался хлороз, чего не наблюдалось у растений, инокулированных только Ко. Транс-репликация С β и С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$, жизнеспособность и стабильность С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ подтверждены метолом ПШР. Показано, что СВ^{βC1-/GFP+} сохраняется вплоть до 25 dpi (данные не приведены). Саузернблот-анализ выявил более высокое накопление Ко и С β (рис. 3*a*, δ), в то время как С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ накапливался на более низком уровне (рис. 3*в*).

Флуоресценция GFP в растениях N. benthamiana

Для всех растений, инокулированных *gfp*-содержащей конструкцией, флуоресценцию белка GFP в сайтах инокуляции наблюдали сначала при помощи УФ-лампы, а затем методом флуоресцентной микроскопии. В необработанных (системно зараженных) листьях с помощью УФ-лампы флуоресценция не детектировалась. Впоследствии как инокулированные, так и неинокулированные листья исследовали методом флуоресцентной микроскопии. Во всех инокулированных листьях детектировали заметный уровень флуоресценции GFP по сравнению с фрагментами ложно обработанного листа (рис. 4). Тем не менее, в системно зараженных листьях выявлены лишь разрозненные участки флуоресценции GFP в растениях, обработанных конструкцией CLCuMB-GFP совместно с Ко или Ко + CLCuMB (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Геминивирусы реплицируются с помощью интермедиатной двухцепочечной ДНК в ядрах инфицированных клеток растений [26, 41]. Много усилий было приложено для того, чтобы установить точную локализацию геминивирусов в клетках растения-хозяина. Уже показано, что ДНК геминивируов локализуется исключительно в ядре зараженной клетки хозяина. Например, в ходе инфекции вирусом золотистой мозаики томата (tomato golden mosaic virus; TGMV) растений *N. benthamiana* вирионы аккумулировались в виде паракристаллических скоплений в ядрах – как в клетках сосудистой системы, так и в других клетках [42]. Конденсация хроматина и изменения в структуре ядра, наблюдаемые при заражении TGMV, также были обусловлены присутствием вирусной ДНК в ядре [43]. Кроме того, исследования гибридизации in situ как монопартитных [44, 45], так и бипартитных [46, 47] геминивирусов показали, что вирусная ДНК накапливается в ядрах инфицированных клеток, но обычно ограничивается тканями проводящей системы. До на-

Таблица 2. Анализ инфекционной способности и выраженности симптомов, вызванных вирусом CLCuKoV, в присутствии и в отсутствие CLCuMB и CLCuMB-GFP

	Анализ инфекционности										
Инокулят ^а	ПЦР-диагностика (инфицированные растения/инокулированные растения)						Саузерн-блотинг ^ь			Симптомы ^с	Латент- ный
	эксперимент І			эксперимент II				$co^{\beta}C1 - /GEP +$		период, сутки	
	Ко	Сβ	$C\beta^{\beta C1-/GFP+}$	Ко	Cβ	$C\beta^{\beta C1/GFP+}$	Ко	Κο Cβ	Св Срестубии		
Ко	3/3	_/_	-/-	3/3	_/_	-/-	(+)	_/_	n.t.	LC и VT	12
$Ko + C\beta$	5/5	5/5	_/_	5/5	5/5	-/-	(+)	(+)	n.t.	DLC, VT и ST	10
$Ko + C\beta^{\beta C1-/GFP+}$	5/5	_/_	5/5	5/5	-/-	5/5	(+)	n.t.	(+)	LC и VT	12
$ \begin{aligned} & \text{Ko} + C\beta + \\ & + C\beta^{\beta C1 - /GFP +} \end{aligned} $	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	(+)	(+)	(+)	SLC, VT и ST	10
Контроль	0/3	_/_	-/-	0/3	_/_	-/-	(-)	(-)	(-)	NS	

^a Ко – ДНК вируса CLCuKoV, С β – ДНК бетасателлита CLCuMB, С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ – конструкция на основе С β , экспрессирующая GFP. ^b Детекция Ко, С β and С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ гибридизацией Саузерн-блот обозначена как позитивная (+), негативная (–) или неанализированная (n.t.). ^c LC – скручивание листьев, DLC – закручивание листьев книзу, SLC – сильное закручивание листьев, VT – утолщение жилок, ST – отставание в росте, NS – отсутствие симптомов.



Puc. 3. Детекция ДНК CLCuKoV, CLCuMB, и CLCuMB-GFP гибридизацией Саузерн-блот. ДНК CLCuKoV обнаруживали с помощью радиоактивно меченного ампликона гена *CP*, ДНК CLCuMB – с использованием радиоактивно меченного ампликона гена *GP*, дНК CLCuMB – с использованием радиоактивно меченного гена *gfp*. Все зонды содержали радиоактивную метку α-[³²P]dCTP. Образцы ДНК, нанесенные на гель, были получены из верхних листьев ложнообработанных (контрольных) растений (дорожка M), либо необработанных растений (H). *a* – ДНК CLCuKoV (0.5 нг) нанесена как положительный контроль (дорожка *I*), далее нанесены образцы ДНК, выделенные из растений, обработанных Ко (дорожки *2* и *3*), Ко и Сβ (дорожка *4*), Ко и Сβ^{βC1–/GFP+} (дорожки *5* и *6*), а также одновременно Ко, Сβ и Сβ^{βC1–/GFP+} (дорожки *7* и *8*). *б* – ДНК CLCuMB (0.5 нг) нанесена как положительный контроль (дорожка *3*). *в* – Ко и Сβ^{βC1–/GFP+} (дорожка *I*), Ко, Сβ и Сβ^{βC1–/GFP+} (дорожка *2*), Ко, Сβ и Сβ^{βC1–/GFP+} (дорожка *3*). *в* – Ко и Сβ^{βC1–/GFP+} (дорожка *I*), Ко, Сβ и Сβ^{βC1–/GFP+} (дорожка *2* и 3), Ко и Сβ^{βC1–/GFP+} (дорожка *I*), Ко, Сβ и Сβ^{βC1–/GFP+} (дорожка *I*), Ко, Сβ

стоящего времени в исследованиях по локализации белков с использованием GFP его ген присоединяли к отдельным генам бегомовируса или бетасателлита, таким как V2, CP, C4 или β C1 [48—50], с целью выяснить роль этих генов в перемещении вируса или в его локализации. До настоящего момента не было исследований, в которых для выяснения локализации бегомовируса в растении-хозяине кодируемая вирусом ORF была бы заменена на ген gfp.

Геминивирусы реплицируются самостоятельно с очень высокой скоростью, тем самым обеспечивая эффективную амплификацию любого гена, клонированного в их геном [51]. Однако замена вирусного гена на чужеродный может повлиять на основные функции вируса, а встраивание дополнительного гена приведет к увеличению размера вирусного генома, что может нарушить процесс сборки вирионов. Но эти проблемы можно обойти, если использовать в качестве носителя гена ДНК-сателлиты [52, 53].

Бетасателлит CLCuMB использован нами для экспрессии гена *gfp* вместо $\beta C1$ (рис. 1). Полученный рекомбинантный CLCuMB-GFP успешно реплицировался и системно перемещался по растению с помощью родственного хелперного бегомовируса CLCuKoV. Ранее CLCuMB был использован с близким бегомовирусом CLCuMuV и неродственным куртовирусом BCTV для сайленсирования гена *GUS* и экспрессии гена петунии *ChsA*, причем тоже путем замены ORF $\beta C1$ [28]. В результате этого исследования было показано, что совместное введение рекомбинантного бетасателлита CLCuMB и хелперного вируса приводит к сайленсированию гена *GUS* в растениях петунии, а в трансгенных растениях табаках была достигнута гиперпродук-



Рис. 4. Анализ флуоресценции GFP в листьях растений *N. benthamiana*. Листья ложно инфильтрированы (*a*), инокулированы конструкцией С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ (δ) или Ко + С β + С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ (*e*); системно зараженные листья растений, инокулированных Ко + С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ (δ) или Ко + С β + С $\beta^{\beta C1-/GFP+}$ (*e*).

ция белка ChsA. Полученные нами результаты согласуются с этими данными. Таким образом, бетасателлит CLCuMB может быть использован как инструмент для эффективной доставки целевых генов в растения. В аналогичном исследовании авторы использовали возможности CLCuMB для доставки гена В-клеточной лимфомы-2 (*Bcl-2*) наряду с двумя генами оболочки ВИЧ-1, gag и p24, в растения N. benthamiana и N. glutinosa, в результате показав успешную экспрессию генов *p24* и *Bcl-2* в растениях [22, 54]. Бетасателлит CLCuMB использовали и для развития у растений устойчивости к хелперным бегомовирусам. Для этого ген барназы разрезали и встраивали во фланкирующие области CLCuMB таким образом, чтобы он активировался белком Rep, который кодируется хелперным бегомовирусом. Когда растения, обладающие кассетой с бетасателлитом и разделен-

ным геном барназы, заражали вирусом ToLCV, молекулы бетасателлита реплицировались, приводя к экспрессии активного гена барназы, что в свою очередь приводило к разрушению инфицированной клетки [55].

Известно несколько исследований, в которых определяли характер локализации белка βC1 в растительной клетке путем создания химерного белка β C1 и репортерных генов [11, 56–59]. В них показано, что белок ВС1 формирует мультимерные комплексы: точечные или гранулярные тельца – и локализуется по периферии клетки и в ядре. Изучению различных бетасателлитов уделяется большое внимание с целью понять их роль в развитии геминивирусных инфекций. Несмотря на это, только в одной работе описана локализация бегомовируса в присутствии бетасателлита, что удалось выявить методом гибридизации in situ [21]. Поскольку CLCuMB транс-реплицируется разными геминивирусами, использование GFP-продуцирующей конструкции на основе этого бетасателлита позволит выяснить как локализацию геминивирусов в различных тканях растения, так и лучше понять механизм их репликации.

Обработка растений одновременно рекомбинантной конструкцией CLCuMB-GFP, вирусом CLCuKoV и бетасателлитом дикого типа CLCuMB приводила к более выраженной симптоматике по сравнению с растениями, инокулированными CLCuKoV и CLCuMB. Ранее сообщалось, что делеция А-обогащенного участка китайского бетасателлита желтой курчавости листьев томата приводила к смягчению симптомов у растений *N. benthamiana* [60]. Следовательно, серьезность симптомов, вероятно, может быть связана с наличием двух А-богатых участков, один из которых содержится в конструкции CLCuMB-GFP, а второй – в бетасателлите CLCuMB дикого типа. Однако эту гипотезу еще предстоит подтвердить.

В листьях системно зараженных геминивирусом растений *N. benthamiana*, инокулированных конструкцией CLCuMB-GFP, флуоресценцию наблюдали только в отдельных участках листа. Возможно, это определяется паттерном локализации геминивирусов, так как их репликация ограничена флоэмой и они остаются связанными с тканями проводящей системы [46]. С этими данными согласуются полученные нами результаты: методом гибридизации Саузерн-блот выявлен очень низкий уровень продукта CLCuMB-GFP. Кроме того, раньше показано, что CLCuMB локализован в клетках флоэмы и не способен высвобождать монопартитный бегомовирус из этих клеток, в отличие от некоторых бипартитных бегомовирусов [21]. Низкое содержание GFP может быть связано и с размером конструкции CLCuMB-GFP, так как она содержит почти на 350 нуклеотидов больше, чем CLCuMB дикого типа. Хотя

нет прямых сведений относительно влияния размера на продуктивность ДНК-сателлитов, ранее показано, что при введении вставки в геномную последовательность вируса полосатости кукурузы или африканского вируса мозаики маниока сильно снижается эффективность заражения [61, 62], а увеличенный в размере вирусный геном не выдерживает давления отбора на упаковку и транспорт вирусных частиц. Логично предположить, что это справедливо и в случае CLCuMB-GFP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используя световую микроскопию, мы исследовали транс-репликацию CLCuMB-GFP с геминивирусом CLCuKoV. На основании полученных результатов можно рассматривать конструкт CLCuMB-GFP в качестве перспективного репортерного вектора для исследования локализации геминивирусов *in planta*. В дальнейшем планируется продолжить это исследование с использованием конфокальной микроскопии, что позволит выявить новые возможности CLCuMB-GFP и расширить наши знания по локализации геминивирусов в клетках растения.

Авторы выражают искреннюю благодарность Деканату научных исследований Университета им. Короля Фейсала, Королевство Саудовская Аравия (Deanship of Scientific Research, King Faisal University, Kingdom of Saudia Arabia) за публикацию этой исследовательской работы в рамках гранта Nasher track Grant No. 186401.

Статья не содержит исследований с участием людей или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Концепция предложена и экспериментально реализована Z.I. Саузерн-блот-гибридизацию проводили Z.I. и M.N.S, они же подготовили первую рукопись. Корректура выполнена М.К. Окончательный вариант манускрипта прочитан и одобрен всеми авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Saunders K., Stanley J. (1999) A nanovirus-like component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology*. **264**, 142–152.
- Silva J.C.F., Carvalho T.F.M., Basso M.F., Deguchi M., Pereira W.A., Sobrinho R.R., Vidigal P.M.P., Brustolini O.J.B., Silva F.F., Dal-Bianco M., Fontes R.L.F., Santos A.A., Zerbini F.M., Cerqueira F.R., Fontes E.P.B. (2017) Geminivirus data warehouse: a database enriched with machine learning approaches. *BMC Bioinf*. 18, 240–240.
- Briddon R.W., Bull S.E., Amin I., Idris A.M., Mansoor S., Bedford I.D., Dhawan P., Rishi N., Siwatch S.S., Ab-

del-Salam A.M., Brown J.K., Zafar Y., Markham P.G. (2003) Diversity of DNA β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*. **312**, 106–121.

- Briddon R.W., Mansoor S., Bedford I.D., Pinner M.S., Saunders K., Stanley J., Zafar Y., Malik K.A., Markham P.G. (2001) Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. *Virology*. 285, 234–243.
- Iqbal Z., Sattar M.N., Kvarnheden A., Mansoor S., Briddon R.W. (2012) Effects of the mutation of selected genes of cotton leaf curl Kokhran virus on infectivity, symptoms and the maintenance of cotton leaf curl Multan betasatellite. *Virus Res.* 169, 107–116.
- 6. Qazi J., Amin I., Mansoor S., Iqbal J., Briddon R.W. (2007) Contribution of the satellite encoded gene β C1 to cotton leaf curl disease symptoms. *Virus Res.* **128**, 135–139.
- 7. Zhou X. (2013) Advances in understanding begomovirus satellites. *Ann. Rev. Phytopathol.* **51**, 357–381.
- Saeed M. (2007) The role of geminiviral DNA β-satellite in viral pathogenicity and movement. In: *School of Agriculture, Food and Wine*. University of Adelaide: Urrbrae.
- Amin I., Patil B.L., Briddon R.W., Mansoor S., Fauquet C.M. (2011) A common set of developmental miRNAs are upregulated in *Nicotiana benthamiana* by diverse begomoviruses. *Virol. J.* 8, 143.
- Cui X., Li G., Wang D., Hu D., Zhou X. (2005) A begomovirus DNAβ-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *J. Virol.* **79**, 10764–10775.
- Cheng X., Wang X., Wu J., Briddon R.W., Zhou X. (2011) βC1 encoded by tomato yellow leaf curl China betasatellite forms multimeric complexes *in vitro* and *in vivo*. *Virology*. 409, 156–162.
- Zhang T., Luan J.B., Qi J.F., Huang C.J., Li M., Zhou X.P., Liu S.S. (2012) Begomovirus—whitefly mutualism is achieved through repression of plant defences by a virus pathogenicity factor. *Mol. Ecol.* 21, 1294–1304.
- Gnanasekaran P., Ponnusamy K., Chakraborty S. (2019) A geminivirus betasatellite encoded βC1 protein interacts with PsbP and subverts PsbP-mediated antiviral defence in plants. *Mol. Plant Pathol.* 20, 943–960.
- Kamal H., Minhas F.U.A., Farooq M., Tripathi D., Hamza M., Mustafa R., Khan M.Z., Mansoor S., Pappu H.R., Amin I. (2019) *In silico* prediction and validations of domains involved in *Gossypium hirsutum* SnRK1 protein interaction with cotton leaf curl Multan betasatellite encoded βC1. *Front. Plant Sci.* 10.
- Nawaz-ul-Rehman M.S., Briddon R.W., Fauquet C.M. (2012) A melting pot of Old World begomoviruses and their satellites infecting a collection of Gossypium species in Pakistan. *PLoS One.* 7, e40050.
- Tahir M.N., Amin I., Briddon R.W., Mansoor S. (2011) The merging of two dynasties – identification of an African cotton leaf curl disease-associated begomovirus with cotton in Pakistan. *PLoS One.* 6, e20366.

- Sattar M.N., Ligthart M., Kvarnheden A. (2019) Compatibility and interaction of begomoviruses and DNA-satellites causing leaf curl disease in Asia, Africa and Mediterranean Region. *Eur. J. Plant Pathol.* 155, 111–124.
- Tiwari N., Padmalatha K., Singh V., Haq Q., Malathi V. (2010) Tomato leaf curl Bangalore virus (ToLCBV): infectivity and enhanced pathogenicity with diverse betasatellites. *Arch. Virol.* 155, 1343–1347.
- Hameed U., Zia-Ur-Rehman M., Herrmann H.-W., Haider M.S., Brown J.K. (2014) First report of okra enation leaf curl virus and associated cotton leaf curl Multan betasatellite and cotton leaf curl Multan alphasatellite infecting cotton in Pakistan: a new member of the cotton leaf curl disease complex. *Plant Dis.* 98, 1447–1447.
- Borah B., Cheema G., Gill C., Dasgupta I. (2010) A geminivirus-satellite complex is associated with leaf deformity of mentha (Mint) plants in Punjab. *Indian J. Virol.* 21, 103–109.
- 21. Eini O., Rasheed M., Randles J. (2017) *In situ* hybridization and promoter analysis reveal that cotton leaf curl Multan betasatellite localizes in the phloem. *Acta Virol.* **61**, 23–31.
- Kharazmi S., Ataie Kachoie E., Behjatnia S.A.A. (2016) Cotton leaf curl Multan betasatellite DNA as a tool to deliver and express the human B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) gene in plants. *Mol. Biotechnol.* 58, 362–372.
- Saeed M. (2010) Tomato leaf curl New Delhi virus DNA A component and cotton leaf curl Multan betasatellite can cause mild transient symptoms in cotton. *Acta Virol.* 54, 317–318.
- Iqbal Z., Shafiq M., Ali I., Mansoor S., Briddon R.W. (2017) Maintenance of cotton leaf curl Multan betasatellite by tomato leaf curl New Delhi virus-analysis by mutation. *Front. Plant Sci.* 8, 2208.
- Hamza M., Tahir M.N., Mustafa R., Kamal H., Khan M.Z., Mansoor S., Briddon R.W., Amin I. (2018) Identification of a dicot infecting mastrevirus along with alpha- and betasatellite associated with leaf curl disease of spinach (*Spinacia oleracea*) in Pakistan. *Virus Res.* 256, 174–182.
- Hanley-Bowdoin L. Settlage S.B. Orozco B.M. Nagar S. Robertson D. (2000) Geminviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 35, 105–140.
- Nawaz-ul-Rehman M.S., Mansoor S., Briddon R.W., Fauquet C.M. (2009) Maintenance of an Old World betasatellite by a New World helper begomovirus and possible rapid adaptation of the betasatellite. *J. Virol.* 83, 9347–9355.
- Kharazmi S., Behjatnia S.A.A., Hamzehzarghani H., Niazi A. (2012) Cotton leaf curl Multan betasatellite as a plant gene delivery vector trans-activated by taxonomically diverse geminiviruses. *Arch. Virol.* 157, 1269–1279.
- 29. Kumar J., Gunapati S., Kumar J., Kumari A., Kumar A., Tuli R., Singh S.P. (2014) Virus-induced gene silencing using a modified betasatellite: a potential candidate for

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

functional genomics of crops. Arch. Virol. 159, 2109–2113.

- Hanley-Bowdoin L., Bejarano E.R., Robertson D., Mansoor S. (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 777–788.
- Kumar J., Kumar J., Singh S.P., Tuli R. (2014) Association of satellites with a mastrevirus in natural infection: complexity of Wheat dwarf India virus disease. *J. Virol.* 88, 7093–7104.
- 32. Fiallo-Olivé E., Tovar R., Navas-Castillo J. (2016) Deciphering the biology of deltasatellites from the New World: maintenance by New World begomoviruses and whitefly transmission. *New Phytol.* 212, 680–692.
- 33. Rybicki E.P. (2009) Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discov. Today.* **14**, 16–24.
- 34. Chung H.Y., Lee H.H., Kim K.I., Chung H.Y., Hwang-Bo J., Park J.H., Sunter G., Kim J.B., Shon D.H., Kim W., Chung I.S. (2011) Expression of a recombinant chimeric protein of hepatitis A virus VP1-Fc using a replicating vector based on Beet curly top virus in tobacco leaves and its immunogenicity in mice. *Plant Cell Rep.* 30, 1513–1521.
- Baulcombe D.C., Chapman S., Santa Cruz S. (1995) Jellyfish green flourescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* 7, 1045–1053.
- 36. Briddon R.W., Bull S.E., Mansoor S., Amin I., Markham P.G. (2002) Universal primers for the PCRmediated amplification of DNA β: a molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Mol. Biotechnol.* 20, 315–318.
- Siemering K.R., Golbik R., Sever R., Haseloff J. (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6, 1653–1663.
- Mansoor S., Briddon R.W., Bull S.E., Bedford I.D., Bashir A., Hussain M., Saeed M., Zafar M.Y., Malik K.A., Fauquet C., Markham P.G. (2003) Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA β. *Arch. Virol.* 148, 1969–1986.
- Hussain M., Mansoor S., Iram S., Zafar Y., Briddon R.W. (2007) The hypersensitive response to tomato leaf curl New Delhi virus nuclear shuttle protein is inhibited by transcriptional activator protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 1581–1588.
- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. (1983) A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19–21.
- Gutierrez C. (2000) DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* 19, 792–799.
- Rushing A.E., Sunter G., Gardiner W.E., Dute R.R., Bisaro D.M. (1987) Ultrastructural aspects of tomato golden mosaic virus infection in tobacco. *Phytopathology*. 77, 1231–1236.
- Bass H.W., Nagar S., Hanley-Bowdoin L., Robertson D. (2000) Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. *J. Cell Sci.* 113, 1149–1160.

- Morilla G., Krenz B., Jeske H., Bejarano E.R., Wege C. (2004) Tête à tête of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl Sardinia virus in single nuclei. *J. Virol.* 78, 10715–10723.
- Rojas M.R., Jiang H., Salati R., Xoconostle-Cázares B., Sudarshana M.R., Lucas W.J., Gilbertson R.L. (2001) Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, tomato yellow leaf curl virus. *Virology*. 291, 110–125.
- Morra M.R., Petty I.T.D. (2000) Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell.* 12, 2259–2270.
- 47. Wege C., Saunders K., Stanley J., Jeske H. (2001) Comparative analysis of the tissue tropism of bipartite geminiviruses. *J. Phytopathol.* **149**, 359–368.
- Poornima Priyadarshini C.G., Ambika M.V., Tippeswamy R., Savithri H.S. (2011) Functional characterization of coat protein and V2 involved in cell to cell movement of cotton leaf curl Kokhran virus-Dabawali. *PLoS One.* 6, e26929.
- Chowda-Reddy R.V., Achenjang F., Felton C., Etarock M.T., Anangfac M.-T., Nugent P., Fondong V.N. (2008) Role of a geminivirus AV2 protein putative protein kinase C motif on subcellular localization and pathogenicity. *Virus Res.* 135, 115–124.
- Teng K., Chen H., Lai J., Zhang Z., Fang Y., Xia R., Zhou X., Guo H., Xie Q. (2010) Involvement of C4 protein of beet severe curly top virus (family *Geminivir-idae*) in virus movement. *PLoS One.* 5, e11280.
- Hayes R.J., Petty I.T.D., Coutts R.H.A., Buck K.W. (1988) Gene amplification and expression in plants by a replicating geminivirus vector. *Nature*. 334, 179–182.
- 52. Scholthof H.B., Scholthof K.-B.G., Jackson A.O. (1996) Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* **34**, 299–323.
- Peretz Y., Mozes-Koch R., Akad F., Tanne E., Czosnek H., Sela I. (2007) A universal expression/silencing vector in plants. *Plant Physiol.* 145, 1251–1263.
- 54. Kachoie A.E. Behjatnia S.A.A., Kharazmi S. (2018) Expression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) coat protein genes in plants using cotton leaf curl Multan betasatellite-based vector. *PLoS One.* 13, e0190403.
- Pakniat-Jahromy A., Behjatnia S.A.A., Dry I.B., Izadpanah K., Rezaian M.A. (2010) A new strategy for generating geminivirus resistant plants using a DNA betasatellite/split barnase construct. *J. Virol. Methods.* 170, 57–66.
- 56. Kumar P.P., Usha R., Zrachya A., Levy Y., Spanov H., Gafni Y. (2006) Protein-protein interactions and nuclear trafficking of coat protein and βC1 protein associated with Bhendi yellow vein mosaic disease. *Virus Res.* 122, 127–136.
- 57. Saeed M., Y. Zafar Y., Randles J.W., Rezaian M.A. (2007) A monopartite begomovirus-associated DNA β satellite substitutes for the DNA B of a bipartite begomovirus to permit systemic infection. *J. Gen. Virol.* **88**, 2881–2889.

- Sharma P., Ikegami M. (2010) Identification of the virulence factors and suppressors of posttranscriptional gene silencing encoded by Ageratum yellow vein virus, a monopartite begomovirus. *Virus Res.* 149, 19–27.
- Zhang S.C., Wege C., Jeske H. (2001) Movement proteins (BC1 and BV1) of abutilon mosaic geminivirus are cotransported in and between cells of sink but not of source leaves as detected by green flourescent protein tagging. *Virology*. 290, 249–260.
- Tao X., Qing L., Zhou X. (2004) Function of A-rich region in DNAβ associated with tomato yellow leaf curl China virus. *Chin. Sci. Bull.* **49**, 1490–1493.
- 61. Etessami P., Watts J., Stanley J. (1989) Size reversion of african cassava mosaic virus coat protein gene deletion mutants during infection of *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* **70**, 277–289.
- Shen W.-H., Hohn B. (1991) Mutational analysis of the small intergenic region of maize streak virus. *Virology*. 183, 721–730.

COTTON LEAF CURL MULTAN BETASATELLITE AS A TOOL TO STUDY THE LOCALIZATION OF GEMINIVIRUSES IN PLANTS

Z. Iqbal^{1, *, **}, M. N. Sattar², and M. Khurshid³

¹Central Laboratories, King Faisal University, Al-Ahsa, 31982 Kingdom of Saudi Arabia ²Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture and Food Sciences, King Faisal University, Al-Ahsa, 31982 Kingdom of Saudi Arabia ³Institute of Biochemistry and Biotechnology, University of the Punjab,

Quaid-e-Azam Campus, Lahore, 54590 Pakistan *e-mail: zafar@kfu.edu.sa

**e-mail: zafariqbal2009@gmail.com

Cotton leaf curl Multan betasatellite (CLCuMB) is a ubiquitous betasatellite commonly found along with cotton leaf curl disease (CLCuD) associated begomoviruses in the Old World. It has a promiscuous replicative nature and trans-replicated by a diverse range of geminiviruses. CLCuMB encodes a single ORF, β C1, in the complementary direction and has pathogenicity, symptoms determinant, suppressor of post-transcription and transcription gene silencing functions. After substituting the β C1 gene with the target gene, it has been used successfully as a gene delivery vector. In the present study, the β C1 gene of CLCuMB was substituted with the green fluorescent protein (GFP) gene, and the resulting construct utilized as a reporter vector to decipher *in planta* localization of geminiviruses. The recombinant CLCuMB expressing GFP (CLCuMB-GFP) was co-inoculated to *Nicotiana benthamiana* plants either with Cotton leaf curl Kokharan virus (CLCuKoV) alone or in a combination with the wild type CLCuMB to investigate the objectives of the study. Results showed that CLCuKoV successfully supported the replication and systemic movement of CLCuMB-GFP either alone or in the presence of wild type CLCuMB. The presence of CLCuMB-GFP was readily detected with PCR and Southern blot hybridization. The modified CLCuMB may serve as a tool useful for *in planta* localization of geminiviruses.

Keywords: cellular localization, CLCuKoV, CLCuMB, expression vector, green fluorescent protein

УДК 577.218:577.27

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ SP1 И FOXA1 В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *IL33* В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКА ЛЕГКОГО

© 2021 г. А. М. Горбачева^{*a*, *}, Д. В. Купраш^{*a*, *b*}, Н. А. Митькин^{*a*}

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия ^bБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,

Москва, 119991 Россия *e-mail: alisamur93@mail.ru Поступила в редакцию 27.03.2020 г. После доработки 02.07.2020 г. Принята к публикации 02.07.2020 г.

Интерлейкин-33 (IL-33) относится к семейству цитокинов IL-1 и известен, в первую очередь, как медиатор гуморального иммунного ответа. Он обеспечивает защиту барьерных тканей, а также принимает участие в развитии многих заболеваний. Результаты исследований свидетельствуют о негативной роли этого цитокина в канцерогенезе: он индуцирует деление и выживание раковых клеток, ремоделирование опухолевого микроокружения и создает условия для иммуносупрессии. Высокий уровень IL-33 наблюдается при многих типах злокачественных опухолей и коррелирует с неблагоприятным прогнозом для пациентов, что позволяет считать этот цитокин перспективной мишенью для иммунотерапии опухолей. Тем не менее механизмы регуляции экспрессии IL-33 в опухолевых клетках недостаточно исследованы. Нами показано, что экспрессия IL-33 в линиях клеток опухоли легкого и молочной железы зависит, по крайней мере частично, от активности транскрипционных факторов SP1 и FOXA1. Этот регуляторный механизм при определенных условиях приводит к повышению уровня IL-33, что ассоциируется с прогрессией опухоли и стимуляцией ее метастазирования.

Ключевые слова: IL-33, экспрессия гена, SP1, FOXA1 **DOI:** 10.31857/S0026898421010067

введение

Наряду с иммунными клетками важную роль в регуляции опухолевого роста играют компоненты матрикса, хемокины и цитокины, способствующие развитию воспаления в опухолевом очаге [1, 2]. Эффект, оказываемый воспалением, опосредован индукцией геномной нестабильности, возникновением эпигенетических модификаций, стимуляцией пролиферации и устойчивости раковых клеток к апоптозу, а также активацией метастазирования [3].

Цитокин интерлейкин-33 (IL-33), член суперсемейства цитокинов IL-1, — важный участник опухолеассоциированного воспаления и ответной реакции на инвазию опухоли [4]. Многочисленные данные подтверждают проопухолевую роль IL-33, ассоциированную с иммуносупрессией опухолевого окружения и стимуляцией метастазирования, что позволяет считать этот цитокин потенциально важной мишенью для иммунотерапии рака [5, 6]. Известно, что IL-33 направленно взаимодействует с онкогенами, индуцируя пролиферацию, трансформацию и миграцию опухолевых клеток [6, 7]. На мышиной модели показано, что IL-33 стимулирует метастазирование раковых клеток, сопровождающееся накоплением в области опухоли клеток-супрессоров миелоидного происхождения (MDSCs) и T-регуляторных клеток, а также подавлением цитотоксичности естественных киллеров [8]; при этом появление IL-33 в опухолевом микроокружении вызывает не только аккумуляцию MDSCs, но и увеличение иммуносупрессивной функции этих клеток [9].

Показано, что уровень экспрессии IL-33 повышен у пациентов с различными типами опухолей: раком легкого [10, 11] и молочной железы [6, 12], колоректальным раком [13], плоскоклеточным раком головы и шеи [7], а также раком желудка [14]. У пациентов с раком легкого и молочной железы высокий уровень IL-33 в сыворотке и строме опухоли положительно коррелирует с прогрессией заболевания, что предполагает возможное использование цитокина в качестве прогностического маркера [11, 12]. Повышенный уровень экспрессии *IL33*, наблюдаемый в клетках опухолевого окружения, приводит к стимуляции альтернативно активированных макрофагов и опухолеассоциированных фибробластов [7].

Несмотря на очевидную важность цитокина IL-33 в прогрессии рака, о механизмах контроля его экспрессии в нормальных тканях и опухоли сведений немного. Установлено, что промотор основной полноразмерной формы мРНК IL-33 человека включает чувствительную к стимуляции интерфероном последовательность ISRE и несколько сайтов GAS (от "gamma interferon activation sites"), чувствительных к интерферону гамма [15].

Ранее нами показано, что в клетках карциномы легких NCIH-196 транскрипционный фактор CREB1 повышает активность промотора гена *IL33*, содержащего рисковый аллель полиморфизма rs928413 [16]. Изучение детальных аспектов регуляции экспрессии *IL33* и способов воздействия на нее позволит расширить имеющиеся знания о взаимодействии иммунной системы с раковыми клетками. В ходе данного исследования выявлены ключевые участки промотора *IL33*, важные для его активности в клетках опухоли легкого и молочной железы человека, а также идентифицированы транскрипционные факторы SP1 и FOXA1 как регуляторы экспрессии гена *IL33*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии. Линия карциномы легких человека NCIH-196 получена из Американской коллекции типовых культур (АТСС, США). Клетки культивировали в ростовой среде RPMI-1640 ("Life Technologies", США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; "Thermo Fisher Scientific", США). Клетки рака молочной железы человека MCF-7 любезно предоставлены Е. Zabarovsky из Каролинского института (Стокгольм, Швеция), аутентичность локального стока клеток MCF-7 была подтверждена в 2016 году с использованием метода коротких тандемных повторов (STR-анализ), проведенного на коммерческой основе ("Гордиз", Россия). Линию MCF-7 культивировали в ростовой среде DMEM ("Life Technologies") с добавлением 10% FBS.

Создание люциферазных репортерных конструкций. Варианты промотора *IL33* №2 (-1398/+79) и №3 (-786/+79) амплифицированы на основе имеющегося варианта №1 (-2512/+79) [16] с использованием праймеров, содержащих сайты рестрикции HindIII и NcoI. Последовательности используемых праймеров приведены в табл. 1. Варианты промотора *IL33* №1, содержащие делеции и мутации потенциальных сайтов связывания SP1 и FOXA1, амплифицировали методом двухэтапной ПЦР и проверяли последующим секвенированием. Для каждого варианта промото-

ра с делециями 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 амплифицировали по 2 фрагмента (в табл. 1 обозначены как А и В. фрагмент А – находился с 5'-конца относительно делеции, фрагмент В – с 3'-конца), подвергали их рестрикции по внесенному сайту BamHI и лигировали. Для фрагментов 2А, 3А, 4А, 5А, 6А, 7А, 8А, 9 в качестве прямого праймера брали тот, с которым проводили амплификацию промотора *IL33* №1. Для фрагментов 1, 2В, 3В, 4В, 5В, 6В, 7В, 8В в качестве обратного праймера использовали подобранный для амплификации промотора *IL33*. Для внесения точечных мутаций применяли перекрывающиеся праймеры, содержавшие в себе мутированные сайты связывания SP1 и FOXA1; при этом прямой праймер использовали в паре с обратным праймером для амплификации промотора *IL33* №1, а обратный праймер – в паре с прямым праймером для амплификации промотора *IL33* №1. Затем амплифицировали перекрывающиеся фрагменты промотора, содержавшие мутированные сайты, и проводили overlap-ПЦР. Все исследуемые варианты промотора IL33 клонировали в вектор pGL3 basic ("Promega", CША), содержащий репортерный ген люциферазы Firefly, по сайтам рестрикции HindIII и NcoI.

Трансфекция клеток NCIH-196 и MCF-7 и тест люциферазной активности. Клетки MCF-7 (по 1 млн на точку) трансфицировали 5 мкг плазмидной ДНК (оригинальный вектор pGL3 basic и его модификации, содержащие регуляторные элементы гена IL33) и 100 нг контрольного репортерного вектора pRL-CMV. содержащего ген люциферазы Renilla ("Promega", США), с использованием капиллярного электропоратора Neon ("Thermo Fisher Scientific"). Электропорацию проводили при следующих условиях: напряжение импульса – 1100 В, длительность импульса – 30 мс, число импульсов – 2. Клетки NCIH-196 (по 1 млн на точку) трансфицировали 1.8 мкг плазмидной ДНК и 0.2 мкг вектора pRL-CMV. Трансфекцию проводили с использованием мультикомпонентной смеси X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent ("Roche", Швейцария), содержащей липиды, согласно протоколу производителя. Через 24 ч проводили измерение активности люцифераз Firefly и Renilla на люминометре 20/20ⁿ ("TurnerBioSystems", США) с использованием набора Dual-Luciferase Reporter Assay System ("Promega") согласно протоколу производителя. При обработке результатов значения активности люциферазы Firefly нормализовали на активность люциферазы Renilla.

Нокдаун факторов SP1 и FOXA1 с использованием коротких интерферирующих PHK (siPHK). Олигонуклеотидные последовательности специфичных siPHK и контрольной (scrambled) siPHK, подобранные с помощью базы данных NCBI Probe [17] и онлайн-ресурса siPHK Wizard ("Invi-
РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ IL33

Таблица 1. Праймеры для амплификации вариантов промотора IL33, внесения делеций и точечного мутагенеза

Праймер ^а	Последовательность 5' \rightarrow 3'				
IL33-1 fw	GCGAAGCTTACCATTGAGTACAACCAGAA				
IL33-2 fw	TCTAAGCTTTAAGGCATGAAGCATAATTA				
IL33-3 fw	GTCAAGCTTTGTAGATTGAATGGATGTAG				
IL33 rev	AATCCATGGTATTCAGTCTTACCTTGTGA				
1 fw	GGTAAGCTTTTACGAGAGCATTGGCCAAG				
2A rev	GTTGGATCCCTATTAAAAAGTAGCTAACT				
2B fw	GGTGGATCCGGCCAGGCCCCCAGCAAGAA				
3A rev	ACGGGATCCCTTCCAATTTCCAATTTTGT				
3B fw	GGCGGATCCTCAGCCTCTTAAAAGCAGAG				
4A rev	AGGGGATCCTGCTTTTAAGAGGCTGATTT				
4B fw	TCCGGATCCGCCAGACACAGTGGCTCACG				
5A rev	GAGGGATCCCTGGATGAAACAATTTCTAA				
5B fw	GTTGGATCCCCGGGCATGGTGGCGGGCGC				
6A rev	ACGGGATCCCTAATTTTTGTATTTTGTA				
6B fw	AATGGATCCGAGCGAGACTCCATCTCAAA				
7A rev	ACGGGATCCCGTCGCCCAGGCTGGAGTGC				
7B fw	GGCGGATCCATCAATAATTACAATAGATG				
8A rev	GTTGGATCCATATTTGAATTTGCTTCTAC				
8B fw	TCCGGATCCAAGTTTGAAAGAAAAAAGAT				
9 rev	TAACCATGGTCTGTGTCCTTACATTAAAG				
SP1 site mutation fw	AACCTGGGATGCTTAGCTTGAAGTGAGCT				
SP1 site mutation rev	CTTCAAGCTAAGCATCCCAGGTTCACACT				
FOXA1 site mutation fw	CCATCTCAAAATAAATAAGTGTATAAATA				
FOXA1 site mutation rev	ATTCACATATTTATTTATTTTGAGATGGA				

^а fw – прямой праймер, rev – обратный праймер.

voGen", США), синтезированы на коммерческой основе ("Синтол", Россия). Для получения дуплекса siPHK смешивали равные количества смыслового (sense) и антисмыслового (antisense) олигонуклеотидов в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl (pH 8.0) и 20 мМ NaCl, нагревали раствор до 95°С и медленно охлаждали до 25°С. Для определения эффективности работы подобранных вариантов siPHK ими трансфицировали клетки MCF-7 и NCIH-196, после чего оценивали уровень экспрессии мPHK SP1 и FOXA1 методом ПЦР в реальном времени. Для эффективного подавления экспрессии факторов в последующих экспериментах использовали siPHK2 для *SP1* и siPHK1 для *FOXA1*.

Проводили трансфекцию клеток MCF-7 и NCIH-196 полученными siPHK (в количестве 500 пмоль на 5 млн клеток) и через 48 ч трансфицировали клетки люциферазными конструкциями совместно с 200 пмоль двухцепочечной siPHK для обеспечения продолжительного подавления экспрессии генов. Для проведения ПЦР с обрат-

ной транскрипцией (ОТ-ПЦР) через 24 ч после трансфекции siPHK из клеток выделяли PHK и анализировали, как описано ниже. Последовательности siPHK и scrambled-PHK представлены в табл. 2.

Выделение РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени. РНК выделяли методом гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с помощью реагента TRIzol ("Invitrogen", США) по протоколу производителя. Для синтеза первой цепи кДНК использовали набор реактивов MMLV RT kit ("Евроген", Россия). Количественную ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе ABI 7500 Real-Time PCR System ("Applied Biosystems", США) с использованием реактива qPCRmix-HS SYBR+LowROX ("Евроген"). Последовательности праймеров для амплификации кДНК *SP1*, *FOXA1*, *IL33* и *ACTB* (ген β-актина) представлены в табл. 3.

Анализ уровня белков методом иммуноблотинга. Для приготовления клеточных лизатов использо-

siPHK	Последовательность 5' \rightarrow 3'
SP1-siPHK-1 sense	CCACAAGCCCAAACAAUCAtt
SP1-siPHK-1 antisense	UGAUUGUUUGGGCUUGUGGgt
SP1-siPHK-2 sense	GGCAGACCUUUACAACUCAtt
SP1-siPHK-2 antisense	UGAGUUGUAAAGGUCUGCCct
SP1-scrambled sense	GUUCCUCCGAAACUACGUAta
SP1-scrambled antisense	GCUUGGUAUGCGGUAAUCAct
FOXA1-siPHK-1 sense	GGACUUCAAGGCAUACGAAtt
FOXA1-siPHK-1 antisense	UUCGUAUGCCUUGAAGUCCag
FOXA1-siPHK-2 sense	ACAUGACCAUGAACACCAUtt
FOXA1-siPHK-2 antisense	AUGGUGUUCAUGGUCAUGUag
FOXA1-scrambled sense	GTGTACCTAGACGCAAATAgt
FOXA1-scrambled antisense	GGTGCTCCATCGTGTTCAAta

Таблица 2. Последовательности siPHK для нокдауна SP1, FOXA1

вали 5× буфер Лэммли. Белки, содержащиеся в образцах (по 0.2×10^6 клеток на точку), разделяли электрофорезом в полиакриламилном геле в ленатурирующих условиях (0.375 М Трис-HCl, pH 8.8, 12% акриламид, 0.1% SDS) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (4°С, 3 ч). Эффективность переноса белков оценивали по окрашиванию мембраны красителем Понсо. Блокировали незанятые участки мембраны 5%-ным раствором обезжиренного сухого молока в буфере TBST, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 150 мМ NaCl, 0.1% Tween-20, при 25°С в течение 30 мин и инкубировали с антителами к IL-33 (ab54385; "Abcam", Великобритания) в разведении 1 : 1 000 и к β-актину (ab8229; "Abcam") в разведении 1 : 3000. Визуализацию полос проводили с использованием субстрата Supersignal West Dura ("Thermo Fisher Scientific") и ChemiDoc XRS+ ("BioRad", США). Для обработки изображений использовали программу ImageJ.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Для

Таблица 3.	Праймеры для	ОТ-ПЦР
------------	--------------	--------

Праймер	Последовательность $5' \rightarrow 3'$
IL33 fw	GACTCCTCCGAACACAGAGC
IL33 rev	GGCCTTCTGTTGGGATTTTCC
SP1 fw	TTGAAAAAGGAGTTGGTGGC
SP1 rev	TGCTGGTTCTGTAAGTTGGG
FOXA1 fw	CGCTTCGCACAGGGCTGGAT
FOXA1 rev	TGCTGACCGGGACGGAGGAG
ACTB fw	TGCGTGACATTAAGGAGAAG
ACTB rev	GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT

определения статистической значимости различий между двумя независимыми выборками применяли двусторонний непарный *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при значениях P < 0.01 и P < 0.005. Вне зависимости от типа эксперимента каждый образец был представлен как минимум в трех биологических повторах. Данные на графиках представлены в виде среднего и стандартных ошибок среднего (планки погрешностей).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Участок — 2512/—1399 промотора IL33 отвечает за повышение его базовой активности

Для определения возможных механизмов регуляции экспрессии гена *IL33* необходимо было идентифицировать его *цис*-регуляторные элементы. Для достижения этой цели мы использовали UCSC Genome Browser (http://genome.ucsc.edu/, сборка Human Feb. 2009 GRCh37/hg19). В качестве маркеров регуляторных элементов использовали несколько характерных признаков: чувствительность регуляторных областей к ДНКазе I, их ассоциация с такими модификациями гистонов, как H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, а также скопление в зоне *цис*-регуляторных элементов потенциальных участков связывания ядерных транскрипционных факторов. Результаты поиска приведены на рис. 1*a*.

Ранее, с учетом описанных признаков, нами идентифицирован дистальный промотор *IL33* (промотор № 1, 2512 п.о. от старта транскрипции) [16]. На основе вышеописанного биоинформатического анализа мы предположили, что ключевые участки, важные для активности промотора *IL33*, могут располагаться ближе к старту транскрипции. Для проверки гипотезы на основе промотора



№1 были амплифицированы варианты №2 и №3 (рис. 16). В качестве модельной системы для измерения уровня активности регуляторных элементов использовали линии опухоли молочной железы человека МСF-7 и карциномы легких NCIH-196, отличающиеся повышенной экспрессией гена *IL33*. Активность промотора в исследуемых линиях определяли по активности люциферазы *Firefly*, нормализованной на активность люциферазы *Renilla*. Представленные на рис. 16 результаты позволяют сделать вывод, что наибольшей активностью обладает первый вариант промотора, в то время как сокращение его длины в вариантах 2 и 3 приводит к падению интенсивности генной экспрессии. Данный эффект проявлялся в обеих линиях клеток и был статистически значимым. Подобный результат может быть обусловлен наличием в промоторе №1 участков, критически важных для модуляции его активности. В частности зоны, локализованные в области -2512/-1399 п.о. и отсутствующие в промоторах №2 и 3, содержат предсказанные сайты связывания ключевых транскрипционных факторов. Учитывая полученные результаты, в последующих экспериментах мы использовали вариант промотора *IL33* №1.



Рис. 2. Делеции участков -1872/-1745 и -1744/-1618 приводят к наибольшему падению активности промотора *IL33* №1 в клетках MCF-7 и NCIH-196. Слева приведена схема расположения делеций на участке промотора *IL33* №1 (-2512/-1399 п.о.). Справа показан результат измерения активности делеционных вариантов промотора *IL33* №1 в люциферазной репортерной системе. Уровень активности промотора соответствует уровню активности люциферазы *Firefly* в клеточных лизатах, нормализованному на активность люциферазы *Renilla*. Представлен результат пяти независимых экспериментов. *P < 0.01, **P < 0.005 по отношению к варианту промотора *IL33* № 1. Отличие всех вариантов промотора *IL33* от плазмиды pGL3 basic статистически достоверно (P < 0.005).

Участки — 1872/—1745 и — 1744/—1618 играют ключевую роль в регуляции активности промотора IL33 №1

Для выявления зон, играющих ключевую роль в активности промотора $IL33 \ Nel$, применили метод делеционного мутагенеза. На рис. 2 представлен нормализованный результат измерения сигнала биолюминесценции продукта люциферазной реакции *Firefly* (собраны данные, полученные в 5 независимых экспериментах).

Согласно полученным результатам, в обеих линиях клеток все делеции, кроме 3 и 9, приводят к снижению базового уровня активности промотора *IL33* №1. Наиболее сильное падение активности происходит при удалении участков 6 и 7, что говорит о критической роли этих зон в регуляции активности промотора *IL33* №1.

Подавление экспрессии факторов SP1 и FOXA1 ассоциировано со снижением активности промотора и уровня экспрессии гена IL33

Для определения функциональной роли участков 6 и 7 промотора *IL33* в этих зонах провели поиск потенциальных сайтов связывания транскрип-

ционных факторов, используя базу данных JASPAR (www.jaspar.genereg.net). В результате при пороге значимости 90% были сформированы два списка сайтов для факторов с наиболее высоким рейтингом: ZNF460, SP1, SREBF1, TFAP2A, SREBF2 для участка 6 и ONECUT1, POU4F1, FOXD2, FOXD1, FOXA1 для участка 7. Мы исключили из рассмотрения ZNF460, ONECUT1, POU4F1, TFAP2A. FOXD2 и FOXD1. так как в обеих исследуемых линиях эти факторы экспрессируются на низком уровне (согласно данным базы CCLE: www.broadinstitute.org/ccle). Факторы SREBF1 и SREBF2 оказались нерелевантными для исследования в силу их биологической роли: они участвуют в регуляции липидного обмена [18], а также в развитии диабета 2 типа [19] и сердечно-сосудистых заболеваний [20].

Следует сказать, что факторы SP1 (5'-GCTC-CGCCTCC-3' на минус-цепи; -1801/-1791) и FOXA1 (5'-TATTTATTTATTTTG-3' на минус-цепи; -1728/-1714), согласно литературным данным, принимают участие в канцерогенезе. Многие опухоли, включая рак легкого, отличаются повышенной экспрессией фактора SP1 [21, 22], а высокий уровень экспрессии FOXA1 наблюдает-



Рис. 3. Снижение экспрессии фактора SP1 ассоциировано с уменьшением активности промотора *IL33* в клетках MCF-7 и NCIH-196. *a* – PHK-интерференция приводит к подавлению экспрессии фактора SP1; "siPHK" и "scrambled PHK" означают добавление siPHK и контрольной PHK соответственно. Данные OT-ПЦР получены с использованием подсчета $\Delta\Delta C_t$, нормализованы на уровень *ACTB* и приведены к уровню экспрессии в контрольной пробе для линии NCIH-196. **P* < 0.01 по отношению к контролю. *б* – Позиционно-весовая матрица для сайта связывания фактора SP1 и схема его мутаганеза. *в* – Подавление экспрессии фактора SP1 и наличие мутаций в сайте его связывания приводит к снижению активности промотора *IL33*. Прямоугольниками обозначены сайты связывания SP1 (оригинальный и мутированный). Представлен нормализованы в 5 независимых экспериментах. * *P* < 0.01 по отношению к контролю; *# P* < 0.01 по отношению к контрольниками обозначены сайты связывания SP1 (оригинальный и мутированный). Представлен нормализованы результат измерения сигнала биолюминесценции продукта люциферазной реакции *Firefly*, полученный в 5 независимых экспериментах. * *P* < 0.01 по отношению к контролю; *# P* < 0.01 по отношению к оригинальному промотору *IL33*. Отличие всех вариантов промотора *IL33* от плазмиды pGL3 basic статистически достоверно (*P* < 0.005).

ся при опухолях легкого и молочной железы [23]. Известно, что SP1 принимает непосредственное участие в канцерогенезе, стимулируя пролиферацию, миграцию и инвазию клеток рака легкого [22], а также способствует прогрессии рака молочной железы [24]. Повышенная экспрессия FOXA1 коррелирует с низкой выживаемостью пациентов с раком легкого [23], а подавление его активности приводит к замедлению роста опухоли легкого [25, 26], а также опухоли молочной железы [27].

На основе вышесказанного мы предположили, что повышение уровня активности промотора гена *IL33* в опухолевых клетках может быть обусловлено связыванием транскрипционных факторов SP1 и FOXA1 со своими сайтами. В свою очередь, повышенный уровень экспрессии *IL33* может способствовать прогрессии опухоли легкого и молочной железы.

Оценку влияния статуса факторов SP1 и FOXA1 на активность промотора гена *IL33* проводили методами точечного мутагенеза и PHKинтерференции (эффективность siPHK определяли, измеряя уровень экспрессии мPHK SP1 и FOXA1) (рис. 3*a*, 4*a*). Клетки MCF-7 и NCIH-196 трансфицировали репортерными конструкциями с вариантами промотора *IL33* №1, содержащими оригинальные либо мутированные сайты связывания SP1 (рис. 36) и FOXA1 (рис. 46), а также специфичными к данным факторам siPHK.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что нокдаун SP1, как и наличие в промоторе мутаций, инактивирующих сайт связывания SP1, приводят к снижению активности промотора IL33 в обеих линиях клеток (рис. 36). В то же время мутагенез сайта связывания FOXA1 и подавление экспрессии этого фактора приводят к аналогичному эффекту только в клетках MCF-7, не вызывая изменения активности промотора IL33 в линии NCIH-196 (рис. 46). Таким образом, связывание SP1 и FOXA1 на промоторе IL33 влияет на его активность, из чего можно предположить участие этих факторов в регуляции транскрипции гена IL33.

С целью исследовать влияние SP1 и FOXA1 на экспрессию гена *IL33* мы провели оценку уровня мРНК и белка IL-33 в клетках MCF-7 и NCIH-196 в условиях подавления экспрессии этих факторов, опосредованного добавлением соответствующих siPHK. Анализ результатов ПЦР в реальном времени показал, что ингибирование



Рис. 4. Снижение экспрессии фактора FOXA1 ассоциировано с уменьшением активности промотора *IL33* в клетках MCF-7. *a* – PHK-интерференция приводит к подавлению экспрессию фактора FOXA1; "siPHK" и "scrambled PHK" означают добавление siPHK к *FOXA1* и контрольной PHK соответственно. Данные OT-ПЦР получены с использованием подсчета $\Delta\Delta C_t$, нормализованы на уровень *ACTB* и приведены к уровню экспрессии в контрольной пробе для линии NCIH-196. * *P* < 0.01 по отношению к контролю. *б* – Позиционно-весовая матрица для сайта связывания фактора FOXA1 и схема его мутаганеза. *в* – Подавление экспрессии фактора FOXA1 и наличие мутаций в сайте его связывания приводит к снижению активности промотора *IL33* в клетках MCF-7. Прямоугольниками обозначены сайты связывания приводит к снижению активности промотора *IL33* в клетках MCF-7. Прямоугольниками обозначены сайты связывания fOXA1 (оригинальный и мутированный). Представлен нормализованный результат измерения сигнала биолюминесценции продукта люциферазной реакции *Firefly*, полученный в пяти независимых экспериментах. * *P* < 0.01 по отношению к оригинальному промотору *IL33*. Отличие всех вариантов промотора *IL33* от плазмиды pGL3 basic статистически достоверно (*P* < 0.005).



Рис. 5. Нокдаун факторов SP1 и FOXA1 вызывает снижение уровня экспрессии мPHK и белка IL-33. Данные OT-ПЦР получены с использованием подсчета $\Delta\Delta C_t$ и нормализованы на уровень мPHK β -актина. Представлены данные пяти независимых экспериментов. * P < 0.01, ** P < 0.005 по отношению к контролю. Снизу представлен воспроизводимый результат оценки уровня белка методом иммуноблотинга, полученный в одном из трех независимых экспериментов.

фактора SP1 приводит к снижению экспрессии *IL33* в клетках MCF-7 (~2 раза) и NCIH-196 (~3 раза), в то время как подавление FOXA1 ассоциировано с падением уровня экспрессии *IL33* только в клетках MCF-7 (~3 раза) (рис. 5). Полученные данные согласуются с результатами теста люциферазной активности (рис. 3*в* и 4*в*) и подтверждают роль факторов SP1 и FOXA1 в регуляции экспрессии *IL33*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прогрессия опухоли часто сопровождается изменением уровня цитокинов, что вызывает снижение ее иммуногенности. Множество экспериментальных данных подтверждает, что повышенная экспрессия IL-33 характерна как для клеток микроокружения, так и для самой опухоли. Высокий уровень этого цитокина в строме и сыворотке опухоли способствует ее прогрессии и метастазированию путем мобилизации клеток-супрессоров миелоидного происхождения, регуляторных Тклеток и гемопоэтических клеток-предшественников костного мозга [8, 28]. Однако механизмы, лежащие в основе прямой регуляции экспрессии IL-33, как в опухолевом, так и в стромальном компартментах, исследованы недостаточно.

Множество данных, свидетельствующих о проопухолевой роли IL-33, получено на различных моделях рака легкого и молочной железы. Известно, что стимуляция клеток рака легкого человека, А549, цитокином IL-33 способствует их метастазированию [29]. IL-33 также повышает пролиферацию и метастазирование клеток немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [10], в то время как блокада этого цитокина значительно подавляет рост ксенотрансплантатов НМРЛ [30]. При раке молочной железы IL-33 способствует росту опухоли, стимулируя пролиферацию клеток эпителия посредством активации сигнальных путей JNK/cJun, MEK/ERK и STAT3 [6]. Также известно, что повышенная экспрессия IL-33 в клетках рака молочной железы коррелирует с их устойчивостью к воздействию тамоксифена, стимулируя возникновение у опухоли свойств, характерных для стволовых клеток [31].

В представленной работе проведен делеционный анализ промотора гена *IL33* и выявлены ключевые участки, важные для его активности. Роль этих участков, по всей видимости, обусловлена наличием в них сайтов связывания транскрипционных факторов SP1 и FOXA1, влияющих на активность промотора и экспрессию гена IL33 в клетках рака легкого человека NCIH-196 и опухоли молочной железы человека MCF-7. Установлено, что фактор SP1 участвует в регуляции экспрессии IL33 в обеих линиях. Полученные результаты согласуются с хорошо известной ролью SP1 в прогрессии рака молочной железы [24] и канцерогенезе рака легкого, которая связана с индукцией пролиферации и метастазирования опухолевых клеток [22]. Необходимо отметить, что выраженность эффекта в обеих линиях, по всей видимости, также связана с высоким уровнем экспрессии SP1 в них. Нами показано, что фактор FOXA1, хорошо известный онкоген, важен для экспрессии гена *IL33* в клетках MCF-7. Согласно литературным данным, FOXA1 стимулирует рост клеток MCF-7 и ответственен за развитие устойчивости к фулвестранту (препарату, используемому для лечения одного из видов метастатического рака молочной железы) [32], в то время как подавление его активности приводит к замедлению роста опухоли молочной железы [27]. Полученные нами результаты не позволяют гово-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

рить о значимом влиянии FOXA1 на активность промотора и экспрессию гена *IL33* в клетках NCIH-196. Вероятно, это может быть связано с низким базальным уровнем экспрессии FOXA1 в этой линии опухолевых клеток.

Как следует из вышесказанного, нами выявлен возможный механизм регуляции экспрессии гена IL33 транскрипционными факторами SP1 и FOXA1. В связи с тем. что в задачи этого исследования не входил анализ прямого связывания SP1 и FOXA1 с промотором IL33, можно предполагать, что их влияние может быть опосредовано лействием промежуточных факторов. Повышенный уровень IL-33, вырабатываемый клетками рака легкого и молочной железы, может способствовать развитию опухолеассоциированного воспаления и возникновению условий иммуносупрессии, что благоприятствует прогрессии опухоли. В ходе дальнейших исследований мы планируем детально проанализировать связывание транскрипционных факторов SP1 и FOXA1 с предсказанными сайтами в промоторе IL33.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-34-01004).

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. Aggarwal B.B., Vijayalekshmi R. V, Sung B. (2009) Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin. Cancer Res.* **15**(2), 425–430.
- Leibovici J., Itzhaki O., Huszar M., Sinai J. (2011) The tumor microenvironment: part 1. *Immunotherapy.* 3, 1367–1384.
- 3. Kumar J., Surh Y. (2008) Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.* **659**, 15–30.
- Liew F.Y., Pitman N.I., McInnes I.B. (2010) Diseaseassociated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 103–110.
- Gao X., Wang X., Yang Q., Zhao X., Wen, WenJiang J., Wu C., Zhang X. (2014) Tumoral expression of IL-33 inhibits tumor growth and modifies the tumor microenvironment through CD8 ⁺ T and NK cells. *J. Immunol.* 194(1), 438-445.
- Kim J.Y., Lim S., Kim G., Yun H.J., Ahn S., Choi H.S. (2014) Interleukin-33/ST2 axis promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via upregulation of COT activity. *Oncogene*. 34(38), 4928–4938.
- Chen S.-F., Nieh S., Jao S.-W., Wu M.-Z., Liu C.-L., Chang Y.-C., Lin Y.-S. (2013) The paracrine effect of cancer-associated fibroblast-induced interleukin-33 regulates the invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* 231, 180–189.

- Jovanovic I.P., Pejnovic N.N., Radosavljevic G.D., Pantic J.M., Milovanovic M.Z., Arsenijevic N.N., Lukic M.L. (2014) Interleukin-33/ST2 axis promotes breast cancer growth and metastases by facilitating intratumoral accumulation of immunosuppressive and innate lymphoid cells. *Int. J. Cancer.* 134, 1669–1682.
- Xiao P., Wan X., Cui B., Liu Y., Qiu C., Rong J., Zheng M., Song Y., Chen L., He J., Tan Q., Wang X., Shao X., Liu Y., Cao X., Wang Q. (2016) Interleukin 33 in tumor microenvironment is crucial for the accumulation and function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*. 5, e1063772.
- Wang C., Chen Z., Bu X., Han Y., Shan S., Ren T., Song W. (2016) IL-33 signaling fuels outgrowth and metastasis of human lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 479, 461–468.
- Hu L., Fu Y., Zhang D., Zhang J. (2013) Serum IL-33 as a diagnostic and prognostic marker in non- small cell lung cancer. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 14, 2563– 2566.
- 12. Liu J., Shen J., Hu J., Huang W., Zhang G. (2014) Significance of interleukin-33 and its related cytokines in patients with breast cancers. *Front. Immunol.* **5**, 141.
- Liu X., Zhu L., Lu X., Bian H., Wu X., Yang W., Qin Q. (2014) IL-33/ST2 pathway contributes to metastasis of human colorectal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 486–492.
- Yu X.X., Hu Z., Shen X., Dong L.Y., Zhou W.Z., Hu W.H. (2015) IL-33 promotes gastric cancer cell invasion and migration via ST2–ERK1/2 pathway. *Dig. Dis. Sci.* 60, 1265–1272.
- Tsuda H., Komine M., Tominaga S., Ohtsuki M. (2017) Identification of the promoter region of human IL-33 responsive to induction by IFNγ. J. Dermatol. Sci. 85, 137–140.
- Gorbacheva A., Korneev K., Kuprash D., Mitkin N. (2018) The risk G allele of the single-nucleotide polymorphism rs928413 creates a CREB1-binding site that activates *IL33* promoter in lung epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2911.
- Hasson S.A., Kane L.A., Yamano K., Huang C.H., Sliter D.A., Buehler E., Wang C., Heman-Ackah S.M., Hessa T., Guha R., Martin S.E., Youle R.J. (2013) High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. *Nature*. 504, 291–295.
- Bommer G.T., MacDougald O.A. (2011) Regulation of lipid homeostasis by the bifunctional SREBF2-miR33a locus. *Cell Metab.* 13, 241–247.
- Moon Y.A., Liang G., Xie X., Frank-Kamenetsky M., Fitzgerald K., Koteliansky V., Brown M.S., Goldstein J.L., Horton J.D. (2012) The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab.* 15, 240–246.
- Park H.J., Georgescu S.P., Du C., Madias C., Aronovitz M.J., Welzig C.M., Wang B., Begley U., Zhang Y., Blaustein R.O., Patten R.D., Karas R.H., Van Tol H.H., Osborne T.F., Shimano H., Liao R., Link M.S., Galper J.B. (2008) Parasympathetic response in chick myocytes and mouse heart is controlled by SREBP. *J. Clin. Invest.* 118, 259–271.

- Hsu T.I., Wang M.C., Chen S.Y., Yeh Y.M., Su W.C., Chang W.C., Hung J.J. (2012) Sp1 expression regulates lung tumor progression. *Oncogene.* 31, 3973–3988.
- Wang R., Xu J., Xu J., Zhu W., Qiu T., Li J., Zhang M., Wang Q., Xu T., Guo R., Lu K., Yin Y., Gu Y., Zhu L., Huang P., Liu P., Liu L., De W., Shu Y. (2018) MiR-326/Sp1/KLF3: a novel regulatory axis in lung cancer progression. *Cell Prolif.* 52(2), e12551.
- Huang C., Yonemura Y., Xiong B., Liu J., Yang X. (2018) Expression and prognosis analyses of forkhead box A (FOXA) family in human lung cancer. *Gene*. 685, 202–210.
- Zhao Y., Ma J., Fan Y., Wang Z., Tian R., Ji W., Zhang F., Niu R. (2018) TGF-β transactivates EGFR and facilitates breast cancer migration and invasion through canonical Smad3 and ERK/Sp1 signaling pathways. *Mol. Oncol.* 12, 305–321.
- 25. Wang H., Liu X.S., Wang G., Zhang F., Meyer C.A., Fei T. (2013) A systematic approach identifies FOXA1 as a key factor in the loss of epithelial traits during the epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *BMC Genomics.* **14**, 680.
- Li J., Zhang S., Zhu L., Ma S. (2018) Role of transcription factor FOXA1 in non-small cell lung cancer. *Mol. Med. Rep.* 17, 509–521.
- Schrijver W., Schuurman K., van Rossum A., Droog M., Jeronimo C., Salta S., Henrique R., Wesseling J., Moelans C., Linn S.C., van den Heuvel M., van Diest P., Zwart W. (2018) FOXA1 levels are decreased in pleural breast cancer metastases after adjuvant endocrine therapy, and this is associated with poor outcome. *Mol. Oncol.* 12, 1884–1894.
- Kaplan R.N., Riba R.D., Zacharoulis S., Bramley A.H., Vincent L., Costa C., MacDonald D.D., Jin D.K., Shido K., Kerns S.A., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J.L., Altorki N., Port E.R., Ruggero D., Shmelkov S. V., Jensen K.K., Rafii S., Lyden D. (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 438, 820–827.
- Yang Z., Gao X., Wang J., Xu L., Zheng Y., Xu Y. (2018) Interleukin-33 enhanced the migration and invasiveness of human lung cancer cells. *OncoTargets Ther.* 11, 843–849.
- 30. Wang K., Shan S., Yang Z., Gu X., Wang Y., Wang C., Ren T., Wang K., Shan S., Yang Z., Gu X., Wang Y., Wang C., Ren T. (2017) IL-33 blockade suppresses tumor growth of human lung cancer through direct and indirect pathways in a preclinical model. *Oncotarget.* 8, 68571–68582.
- Hu H., Sun J., Wang C., Bu X., Liu X., Mao Y., Wang H. (2017) IL-33 facilitates endocrine resistance of breast cancer by inducing cancer stem cell properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485, 643–650.
- Rheinbay E., Parasuraman P., Grimsby J., Tiao G., Engreitz J.M., Kim J., Lawrence M.S., Taylor-Weiner A., Rodriguez-Cuevas S., Rosenberg M., Hess J., Stewart C., Maruvka Y.E., Stojanov P., Cortes M.L., Seepo S., Cibulskis C., Tracy A., Pugh T.J., Lee J., Zheng Z., Ellisen L.W., Iafrate A.J., Boehm J.S., Gabriel S.B., Meyerson M., Golub T.R., Baselga J., Hidalgo-Miranda A., Shioda T., Bernards A., Lander E.S., Getz G. (2017) Recurrent and functional regulatory mutations in breast cancer. *Nature*. 547, 55–60.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

REGULATION OF *IL33* GENE EXPRESSION BY SP1 AND FOXA1 IN BREAST AND LUNG CANCER CELLS

A. M. Gorbacheva^{1, *}, D. V. Kuprash^{1, 2}, and N. A. Mitkin¹

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia ²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia *e-mail: alisamur93@mail.ru

Interleukin-33 (IL-33) is a member of the IL-1 cytokine family, primarily known as a mediator of humoral immune response. It provides protection of barrier tissues and participates in the development of the range of diseases. This cytokine promotes carcinogenesis by induction of proliferation and survival of cancer cells, re-modeling of tumor microenvironment and promoting immunosuppressive conditions. Elevated levels of IL-33 were observed in many types of cancers. This elevation correlates with a poor prognosis, making *IL33* a promising target for cancer immunotherapy. The mechanisms of IL-33 expression regulation in human tumor cells are not well understood. Here, we show that that expression of IL-33 in breast and lung cancer cell lines depends, at least in part, on activity of SP1 and FOXA1 transcription factors. Increase in activity of these transcription factors may be responsible for elevated levels of IL-33 and subsequent progression of tumor.

Keywords: IL-33, gene expression, SP1, FOXA1

— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ —

УДК 618.19-006.6-08:615.28:577.112

РЕЦЕПТОР ФАКТОРА РОСТА СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ ТИПА II (VEGFR2) ВНОСИТ ВКЛАД В ФОРМИРОВАНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭСТРОГЕНПОЛОЖИТЕЛЬНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ТАМОКСИФЕНУ

© 2021 г. Т. А. Дронова^{*a*, *b*, *, Н. Н. Бабышкина^{*a*, *b*, *c*}, М. В. Завьялова^{*a*, *c*}, Е. М. Слонимская^{*d*}, Н. В. Чердынцева^{*a*, *b*}}

^аНаучно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634009 Россия

^bНациональный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

^сСибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, 634050 Россия

^dСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

**e-mail: tanyadronova@mail.ru* Поступила в редакцию 30.05.2020 г. После доработки 20.07.2020 г. Принята к публикации 27.07.2020 г.

Регуляторные взаимодействия рецепторов эстрогенов и рецепторных тирозинкиназ, в том числе рецептора фактора роста сосудистого эндотелия типа II (VEGFR2), считаются ключевым механизмом развития устойчивости клеток рака молочной железы к антиэстрогенному препарату тамоксифену. Высокий уровень экспрессии VEGFR2 рассматривается в качестве маркера резистентности опухоли к тамоксифену. Однако не выявлено значимости функциональных полиморфизмов гена VEGFR2/KDR, ассоциированных с изменением экспрессии и/или продукции кодируемого им белка, в качестве прогностического маркера эффективности тамоксифена. В 122 образцах опухоли молочной железы, полученных от пациенток с прогрессией опухоли (отдаленные метастазы или рецидив) и больных без прогрессии на фоне терапии тамоксифеном, изучены полиморфные локусы гена KDR (rs2071559, rs2305948) и определен уровень его транскрипционной активности методом ПШР в реальном времени; оценка экспрессии VEGFR2 проведена с помощью иммуногистохимического анализа. Частота встречаемости гетерозиготных и мутантных генотипов локуса rs2305948 гена KDR значимо выше у больных с отсутствием прогрессии. Полиморфизм rs2305948 ассоциирован с высокими показателями выживаемости у больных раком молочной железы. Выявлена корреляционная связь межлу уровнем мРНК генов *ESR1* и *KDR* и отсутствием прогрессии рака молочной железы. Полученные результаты свидетельствуют о прогностическом значении rs2305948 и его потенциальном вкладе в формирование чувствительного к тамоксифену фенотипа опухоли.

Ключевые слова: рецептор фактора роста сосудистого эндотелия типа II (VEGFR2), однонуклеотидные полиморфизмы, экспрессия генов, рецептор эстрогенов, тамоксифен, резистентность, рак молочной железы

DOI: 10.31857/S0026898421010055

введение

Антиэстрогенные препараты являются одним из основных компонентов комплексной терапии эстрогенположительного рака молочной железы (РМЖ). Однако несмотря на широкий арсенал антиэстрогенов, стандартом эндокринотерапии как при распространенном РМЖ, так и на ранних стадиях заболевания остается тамоксифен — частичный антагонист рецепторов эстрогенов (ERa) [1]. Применение тамоксифена приводит к снижению риска рецидива и увеличению продолжительности жизни, однако у 20–30% больных РМЖ антиэстрогенный эффект тамоксифена не реализуется [2].

Механизмы формирования резистентности к тамоксифену связаны с нарушением функцио-

Сокращения: РМЖ – рак молочной железы; ЕRα –рецептор эстрогенов; VEGF – фактор роста сосудистого эндотелия; VEGFR1/Flt-1 – рецептор фактора роста сосудистого эндотелия типа I; VEGFR2/Flk-1, KDR – рецептор фактора роста сосудистого эндотелия типа II; SNP – однонуклеотидный полиморфизм.

нирования интегральных сигнальных систем (PI3K/Akt, Ras/MAPK и др.), контролирующих процессы синтеза белка, метаболизма и клеточного роста [3, 4]. Одни из важнейших эффекторов этих внутриклеточных каскадов – белки семейства фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), биологическое действие которых определяется взаимодействием со специфическими тирозинкиназами – рецепторами VEGF типа I (VEGFR1/Flt-1) и типа II (VEGFR2/Flk-1, KDR), причем активация VEGFR2 наиболее важна для передачи внутриклеточного сигнала [5]. Показано, что рост эстрогензависимых клеточных линий РМЖ опосредуется аутокринным действием VEGF, вызывающим активацию VEGFR2 и последующую стимуляцию р38 [6, 7]. Результаты исследований in vitro свидетельствуют о том, что эстрадиол способен индуцировать секрецию VEGF, тогда как тамоксифен, напротив, ингибирует продукцию VEGF и VEGFR2 в культурах клеток MCF-7, отменяя ангиогенный эффект эстрадиола [8]. Получен ряд клинических доказательств прогностической роли VEGFR2 как маркера резистентности к эндокринной терапии. Так, установлено, что высокий уровень VEGFR2 в опухоли связан с низкими показателями безрецидивной выживаемости у больных РМЖ, получавших тамоксифен в адъювантном режиме [9, 10].

Вариабельность экспрессии VEGFR2 может модулироваться полиморфизмами в кодирующих и некодирующих областях гена *KDR*. Из многочисленных однонуклеотидных замен (SNP) на активность гена *KDR* или на экспрессию его белкового продукта влияют полиморфные локусы гs2071559 и rs2305948 [11]. Однако вклад этих генетических вариантов в развитие опухолевого фенотипа, резистентного к тамоксифену, определен в настоящее время недостаточно точно. Кроме того, несмотря на установленное участие VEGFR2 в прогрессии PMЖ, перспективным представляется изучение взаимосвязи генетических особенностей экспрессии данной тирозинкиназы с рецепторным статусом опухоли.

Цель нашей работы состояла в изучении влияния полиморфных локусов rs2071559 и rs2305948 гена *KDR*, его транскрипционной активности и экспрессии кодируемого им белка в опухоли на эффективность терапии тамоксифеном у больных эстрогенположительным РМЖ и оценке прогностического потенциала этих факторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты. В работе использованы образцы опухолевой и прилежащей морфологически нормальной ткани, полученные от 122 женщин, проходивших лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ по поводу РМЖ в период с 2002 по 2014 гг. Клинический диагноз подтвержден данными гистологического исследования. Все больные перенесли радикальное хирургическое вмешательство и принимали тамоксифен в качестве адъювантной гормональной терапии (20 мг/1 раз в сутки). Общая группа больных была разделена на подгруппы в соответствии с прогрессией заболевания: 27 пациенток с отдаленными метастазами или рецидивами составили группу, резистентную к тамоксифену; 95 пациенток без прогрессии вошли в группу, чувствительную к тамоксифену. Среднее время до прогрессирования составило 28.5 \pm 17.8 мес. Исследуемые группы были сопоставимыми по возрасту, стадии и объему проведенного лечения.

Выделение ДНК. ДНК из образцов РМЖ выделяли при помощи наборов QIAamp DNA mini Kit ("Qiagen", Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту выделенной ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop-1000 ("Thermo Scientific", США) (25–400 нг/мкл, соотношение $A_{260}/A_{280} = 2.10-2.35$). Целостность ДНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза (TapeStation, "Agilent Technologies", США).

Генотипирование. Генотипирование **SNP** rs2071559 и rs2305948 гена KDR проведено методом ППР в режиме реального времени с использованием гибридизационных TagMan-зондов. Подбор праймеров и зондов осуществляли с помощью программы OligoAnalysisVector NTI www.ncbi.nlm.nih.gov (табл. 1). Условия реакции, а также последовательности олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов описаны ранее [12]. Кривые накопления флуоресценции проанализированы с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX96 Manager 3.1 ("Bio-Rad", CIIIA). Качество генотипирования контролировали реамплификацией 5% случайно отобранных образцов со 100%-ной воспроизводимостью результатов.

Выделение РНК. РНК из образцов опухолевой и прилежащей нормальной ткани выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit, содержащего ДНКазу I ("Qiagen"). Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали спектрофотометрически на приборе NanoDrop-1000 ("Thermo Scientific"). Концентрация РНК колебалась от 40 до 200 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 1.95 - 2.05$.

Анализ экспрессии генов *KDR* и *ESR1*. кДНК для определения уровня экспрессии генов синтезировали на основе полученных образцов РНК с использованием набора RevertAid[™] ("Fermentas", США) согласно инструкции к набору. ПЦР в реальном времени проводили с использованием специфических праймеров и ТаqMan-зондов (табл. 1) на CFX96 ("Bio-Rad"). Реакционная смесь содержала 250 мкМ dNTP ("Sibenzyme", Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2.5 мМ MgCl₂, 1 × SE-буфер (67 мМ Трис-HCl, pH 8.8 при 25°С, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween-20), 2.5 ед. акт. НоtStart Таq-полимеразы ("Sibenzyme") и 50 нг кДНК. Реакцию проводили в следующем режиме: предварительная денатурация (94°С, 10 мин); затем 40 циклов – 94°С, 10 с и 60°С, 20 с. Относительную экспрессию генов *KDR* и *ESR1* определяли с помощью метода $2^{-\Delta\Delta CT}$ [13], используя ген *GAPDH* в качестве референсного.

Иммуногистохимическое исследование. Экспрессию рецепторов стероидных гормонов, а также белковых продуктов гена *KDR* анализировали на парафиновых срезах ткани опухолей молочной железы с использованием стрептавидин-биотинового метода и системы визуализации фирмы "Dako" LSAB2 System-HRP. Применяли антитела мыши к ERα фирмы "Dako" (клон 1D5, RTU) и рецептору прогестерона (PR) (клон PgR 636, RTU), антитела к VEGFR2 фирмы "Novus Biologicals" (клон 1В6, 1:100). Результаты иммуногистохимического анализа оценивали полуколичественно с использованием светового микроскопа при увеличении ×400, учитывая процент положительно окрашенных клеток и интенсивность их окрашивания в 10 полях зрения каждого среза. Умеренное (2+) или сильное (3+) цитоплазматическое и/или мембранное окрашивание более чем в 10% опухолевых клеток расценивали как VEGFR2положительное, отрицательное окрашивание (0); слабую (1+) экспрессию в <10% клеток – как VEGFR2-негативное.

Статистическая обработка. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS 21.0 (IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, США) и GraphPad Prism 8.0.1. Частоты аллелей и генотипов исследуемых SNP были рассчитаны и протестированы на отклонение от равновесия Харди–Вайнберга. Различия в экспрессии мРНК генов *KDR* и *ESR1* между группами пациентов оценивали с помощью U-критерия Манна—Уитни. Значимость различий между долей VEGFR2-экспрессирующих клеток в изучаемых группах определяли с использованием критерия согласия χ^2 . Корреляционные взаимосвязи оценивали с помощью непараметрического критерия Спирмена. Показатели безметастатической выживаемости рассчитывали по методу Каплана— Мейера. Все тесты были двусторонними, различия считали статистически значимыми при *p* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частоты встречаемости полиморфных вариантов гена KDR у больных эстрогенположительным раком молочной железы в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Результаты анализа двух полиморфных локусов гена KDR у больных с прогрессией и без признаков прогрессии РМЖ на фоне приема тамоксифена представлены в табл. 2. Распределение частот генотипов по локусу rs2071559 в обеих группах соответствовало равновесию Харди-Вайнберга (р = = 0.531 и p = 0.629 соответственно). Распределение частот генотипов полиморфного локуса rs2305948, соответствующее закону Харди-Вайнберга, наблюдалось лишь в группе больных без прогрессии РМЖ (p = 0.902). Отсутствие гетерозигот и гомозигот по мутантному аллелю rs2305948 не позволило определить значимость отклонения от равновесия Харди-Вайнберга в группе с прогрессией опухолевого процесса. Сравнительный анализ частот генотипов и аллелей локуса rs2071559 гена *KDR* не выявил значимых различий между больными исследуемых групп. Однако у пациентов без признаков прогрессии мутантные аллели и генотипы локуса rs2305948 встречались чаще, чем у больных с прогрессированием РМЖ на фоне терапии тамоксифеном (p = 0.015 и p = 0.040; табл. 2).

Локус/ген	Праймеры, нуклеотидные последовательности, $5' \rightarrow 3'$	Зонды, нуклеотидные последовательности, 5' \rightarrow 3'	<i>Т</i> _{отж} , °С
<i>KDR</i> rs2071559	AATCTGGTTGCTCTTAATCAGAAA CACTTCAAACTTGGAGCCG	FAM-TGCCCAGTTCGCCAGCATT ROX-CTTGCCCAGTTCGCCAACATT	60
<i>KDR</i> rs2305948	CTGTTCTTCTTGGTCATCAGC TCTGGGAGTGAGATGAAGAAA	FAM-TGAGCACCTTAACTATAGATGGTATAACC ROX-TGAGCACCTTAACTATAGATGGTGTAAC	61
KDR	ACTCTCTCTGCCTACCTCACCT TACTGACTGATTCCTGCTGTGTT	FAM-TGTATGGAGGAGGAGGAAGTATGTG	60
ESR1	CAGGGTGGCAGAGAAAGATT GTAGCGAGTCTCCTTGGCA	FAM-TGACAAGGGAAGTATGGCTATGGA	60

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов для генотипирования и анализа экспрессии генов

	Частота генотипа				Частота аллеля			
SNP_ID	Генотип	ТАМ-Ч ^а , <i>n</i> (%)	TAM-P ^b , <i>n</i> (%)	р	Аллель	ТАМ-Ч ^а , <i>n</i> (%)	TAM-P ^b , <i>n</i> (%)	р
KDR	TT	31(32.6)	64(67.4)		Т	101(53.2)	89(46.8)	
rs2071559	TC + CC	12(24.4)	15(55.6)	0.264	С	34(63.0)	20(37.0)	0.201
KDR	GG	77(83.7)	15(16.3)		G	166(90.2)	18(9.8)	
rs2305948	GA + AA	26(100.0)	0(0.0)	0.040	А	52(100.0)	0(0.0)	0.015

Таблица 2. Распределение генотипов и аллелей гена KDR в группах больных

^а Группа, чувствительная к тамоксифену. ^b Группа, резистентная к тамоксифену.

Анализ экспрессии мРНК генов KDR и ESR1 у больных исследуемых групп

Изучение особенностей экспрессии исследуемых генов показало, что у пациенток с благоприятным ответом на тамоксифен уровень относительной экспрессии мРНК гена *ESR1* выше, чем у пациенток с прогрессией РМЖ (12.21 ± 3.22, и 0.85 ± 0.32 соответственно, p = 0.009; рис. 1*a*). Отмечена сходная направленность изменений транскрипционной активности гена *KDR* (относительное количество мРНК – 1.85 ± 0.56 в группе



Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК генов *ESR1* (*a*) и *KDR* (*б*) в образцах рака молочной железы от больных группы ТАМ-Ч, чувствительной к тамоксифену, и ТАМ-Р, резистентной к тамоксифену. Результаты представлены как $M \pm$ SE, где M – среднее значение, SE – стандартная ошибка среднего.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

без прогрессии РМЖ и 0.30 ± 0.11 в группе с прогрессией), но статистически значимые различия не обнаружены (рис. 16).

Анализ связи между профилями экспрессии генов в группе больных, чувствительных к тамоксифену, показал значимую корреляционную зависимость (r = 0.458; p = 0.003) в отличие от группы пациенток, резистентных к терапии, в которой отсутствовала такая корреляция (r = 0.657; p = 0.156).

Анализ экспрессии VEGFR2 у больных исследуемых групп

Иммуногистохимическая визуализация белкового продукта гена *KDR* показала, что VEGFR2 чаще экспрессируется в опухолях, резистентных к тамоксифену (68.8%), в то время как VEGFR2негативная экспрессия чаще наблюдается в опухолях, чувствительных к такой терапии (53.8%). Однако найденные различия не достигали уровня статистической значимости (p = 0.112; рис. 2).

Корреляционный анализ не выявил статистически значимой взаимосвязи между уровнем экспрессии мРНК и долей (%) VEGFR2-окрашенных



Рис. 2. Уровень VEGFR2 у больных группы ТАМ-Ч, чувствительной к тамоксифену, и ТАМ-Р – резистентной к тамоксифену. ■ – VEGFR2-позитивная; ■ – VEGFR2-негативная.

клеток (r = 0.219; p = 0.262 в группе, чувствительной к тамоксифену; r = 0.500; p = 0.667 в группе, резистентной к тамоксифену).

Связь исследуемых маркеров с показателями безметастатической выживаемости у больных эстрогенположительным раком молочной железы

Согласно данным сравнительного анализа зависимости безметастатической выживаемости больных от носительства полиморфных локусов гена *KDR*, лучшие показатели отдаленных результатов лечения наблюдаются в группе носителей гетерозиготных и мутантных генотипов, чем у носителей дикого варианта rs2305948 (log-rank p == 0.024; рис. 3*a*). Полиморфный локус rs2071559 гена *KDR* не был ассоциирован с показателями выживаемости (log-rank p = 0.824; рис. 3*b*).

Относительный уровень мРНК генов *ESR1* и *KDR*, а также экспрессия VEGFR2 в опухоли не оказали значимого влияния на показатели безметастатической выживаемости больных (данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование позволило изучить роль тирозинкиназы VEGFR2 в развитии устойчивости к тамоксифену у больных эстрогенположительным РМЖ с учетом вклада ее генетических вариантов, транскрипционной активности и белкового профиля. Мы показали ассоциативную связь носительства гетерозиготных и мутантных вариантов локуса гs2305948 гена *KDR* у больных РМЖ с эффективным ответом на тамоксифен. Наличие этих генетических вариантов высоко коррелирует с лучшим прогнозом выживаемости. Кроме того, у пациентов с успешной гормональной терапией выявлена корреляционная связь между уровнями экспрессии генов *ESR1* и *KDR*.

Следует отметить, что результаты изучения полиморфизма rs2305948 в аспекте эффективности лечения и прогноза клинического течения РМЖ весьма ограничены. Большинство проведенных исследований посвящено анализу рисковой значимости этого генетического варианта, однако полученные данные не подтверждают его роль в формировании РМЖ [14-16]. Försti и соавт. [14] выявили тенденцию к связи мутантного генотипа SNP rs2305948 с высокими показателями общей выживаемости больных РМЖ, другие авторы не нашли доказательств его прогностического значения [17]. Ранее мы обнаружили статистически значимое повышение общей выживаемости у носителей гетерозиготных и мутантных вариантов локуса rs2305948 в группе больных эстрогенположительным РМЖ, получавших тамоксифен [18]. В настоящем исследовании показана прогности-



Рис. 3. Показатели безметастатической выживаемости больных РМЖ, носителей полиморфных локусов rs2305948 (*a*) и rs2071559 (*б*) гена *KDR*.

ческая значимость данных генотипов и в отношении безметастатической выживаемости.

Полиморфизм rs2305948 локализуется в экзоне 7 гена KDR, который кодирует внеклеточную часть рецептора, содержащую семь (D1–D7) Igподобных доменов. Структурно-функциональные исследования показали, что домены D2–D3 критичны для связывания лиганда с высокой аффинностью [19, 20]. Замена валина (V), Сβ-остатка, на более крупный Сү-гидрофобный остаток, изолейцин (I) в положении 297 белка, приводит к изменению конформации соединительной петли β-листа в Ig-подобном домене D3, препятствуя процессу его димеризации [21, 22]. Таким образом, rs2305948 может влиять на активность процессов транс-аутофосфорилирования и внутриклеточной передачи сигнала [11, 23, 24]. Можно полагать, что, снижая эффективность связывания VEGFR2 с лигандом, данная мутация может определять низкую активность VEGFR2-опосредованных пролиферативных сигнальных путей в опухоли, способствующую более эффективному терапевтическому ответу и благоприятному прогнозу заболевания.

Изучаемые в настоящей работе функциональные варианты гена *KDR* были отобраны ранее с целью оценки их предиктивного потенциала у больных эстрогеннегативным РМЖ, получавших предоперационную химиотерапию. Интересно, что дикие генотипы локуса rs2071559 гена KDR представляют собой маркеры эффективности предоперационного лечения с включением капецитабина, тогда как у носителей диких генотипов полиморфного варианта rs2305948 выявлена лишь тенденция к повышению числа полных морфологических регрессий опухоли [12]. Вероятно, что вклад системы VEGF в механизмы прогрессии и развитие лекарственной резистентности эстрогенположительных и эстрогенотрицательных опухолей различен. Так, при эстрогеннегативном PMЖ VEGFR2-опосредованная стимуляция является одним из центральных регуляторных механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к действию цитостатических препаратов. Снижение активации пролиферативных VEGFR2-зависимых эффектов может быть обусловлено модулирующим влиянием других внутриклеточных путей, обладающих как про- так и противоопухолевой направленностью действия [25, 26]. Так, в экспериментах *in vitro* показана способность трансформирующего фактора-В непосредственно подавлять транскрипцию VEGFR2 в эндотелиальных клетках [27]. В случае эстрогенположительных опухолей ключевым сигнальным каскадом, контролирующим гормональную резистентность, является ERa, посредством которого осуществляется регуляция экспрессии VEGFR2 [28, 29]. Обнаруженная нами корреляция уровней экспрессии ESR1 и KDR у пациенток с успешной гормональной терапией может указывать на возможность корецепторных взаимодействий этих генов для обеспечения противоопухолевого действия тамоксифена [30]. Стоит отметить. что нами не выявлено прямой корреляционной зависимости между экспрессией гена KDR и его белкового продукта в опухолях таких больных. Вероятно, подобное несоответствие может быть связано с различными регуляторными механизмами, влияющими на уровень белка, а именно, с нарушением процессов трансляции, синтеза и деградации мРНК, посттрансляционной модификацией белковых продуктов.

Известно, что изменение уровня экспрессии гена *ESR1* наряду со статусом ERα в опухоли может коррелировать с ответом на терапию тамоксифеном у больных эстрогенположительным РМЖ, причем высокий уровень транскрипционной активности *ESR1* связан с чувствительностью к тамоксифену [31], а низкий уровень, напротив, с резистентностью к такой антиэстрогенной терапии [32]. В нашем исследовании высокий уровень мРНК гена *ESR1* наблюдался в опухолях больных, которые не имели прогрессии заболевания после терапии тамоксифеном, что соотносится с результатами представленных выше работ.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что эффект гормональной терапии тамоксифеном в определенной степени зависит от мутации в гене KDR rs2305948. Высокая частота встречаемости гетерозиготных и мутантных генотипов этого полиморфного локуса у пациенток с успешной гормональной терапией, а также их ассоциация с высокой продолжительностью жизни без прогрессии РМЖ позволяет рассматривать данные генетические маркеры в качестве факторов, определяющих благоприятный прогноз при этом заболевании. Координация экспрессии генов ESR1 и KDR может свидетельствовать о низком метастатическом потенопухоли и ее чувствительности циале K тамоксифену.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-29-06037 офи_м "Геномные механизмы регуляции опухолевой прогрессии рака молочной железы в условиях лекарственной терапии").

Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с "Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан" (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288) на основании разрешения комитета по биомедицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burstein H.J., Curigliano G., Loibl S., Dubsky P., Gnant M., Poortmans P., Colleoni M., Denkert C., Piccart-Gebhart M., Regan M., Senn H.J., Winer E.P., Thurlimann B., Members of the St. Gallen International Consensus Panel on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2019. (2019) Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann. Oncol.* 30(10), 1541–1557.
- Cardoso F., Costa A., Senkus E., Aapro M., Andre F., Barrios C.H., Bergh J., Bhattacharyya G., Biganzoli L., Cardoso M.J., Carey L., Corneliussen-James D., Curigliano G., Dieras V., El Saghir N., Eniu A., Fallowfield L., Fenech D., Francis P., Gelmon K., Gennari A., Harbeck N., Hudis C., Kaufman B., Krop I., Mayer M., Meijer H., Mertz S., Ohno S., Pagani O., Papadopoulos E., Peccatori F., Penault-Llorca F., Piccart M.J., Pierga J.Y., Rugo H., Shockney L., Sledge G., Swain S., Thomssen C., Tutt A., Vorobiof D., Xu B., Norton L., Winer E. (2017) 3rd ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 3). *Ann. Oncol.* 28(1), 16–33.

- Clarke R., Tyson J.J., Dixon J.M. (2015) Endocrine resistance in breast cancer – An overview and update. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418(3), 220–234.
- 4. Mills J.N., Rutkovsky A.C., Giordano A. (2018) Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **41**, 59–65.
- Shibuya M. (2011) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes Cancer.* 2(12), 1097–1105.
- Aesoy R., Sanchez B.C., Norum J.H., Lewensohn R., Viktorsson K., Linderholm B. (2008) An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signaling loop confers resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 6(10), 1630–1638.
- Liang Y., Brekken R.A., Hyder S.M. (2006) Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocr. Relat. Cancer.* 13(3), 905–919.
- Garvin S., Nilsson U.W., Dabrosin C. (2005) Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells. *Brit. J. Cancer.* 93(9), 1005–1010.
- Linderholm B.K., Hellborg H., Johansson U., Skoog L., Lehtio J. (2011) Vascular endothelial growth factor receptor 2 and downstream p38 mitogen-activated protein kinase are possible candidate markers of intrinsic resistance to adjuvant endocrine treatment in steroid receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 125(2), 457–465.
- Ryden L., Jirstrom K., Bendahl P.O., Ferno M., Nordenskjöld B., Stal O., Thorstenson S., Jonsson P.E., Landberg G. (2005) Tumor-specific expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 but not vascular endothelial growth factor or human epidermal growth factor receptor 2 is associated with impaired response to adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer. J. Clin. Oncol. 23(21), 4695–4704.
- 11. Wang Y., Zheng Y., Zhang W., Yu H., Lou K., Zhang Y., Qin Q., Zhao B., Yang Y., Hui R (2007) Polymorphisms of *KDR* gene are associated with coronary heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**(8), 760–767.
- BabyshkinaN., Zavyalova M., Tarabanovskaya N., Dronova T., Krakhmal N., Slonimskaya E., Kzhyshkowska J., Choynzonov E., Cherdyntseva N. (2018). Predictive value of vascular endothelial growth factor receptor type 2 in triple-negative breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Mol. Cell. Biochem.* 444(1–2), 197–206.
- 13. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C (T)}. *Method.* **24**(4), 402–408.
- 14. Forsti A., Jin Q., Altieri A., Johansson R., Wagner K., Enquist K., Grzybowska E., Pamula J., Pekala W., Hallmans G., Lenner P., Hemminki K. (2007) Polymorphisms in the *KDR* and *POSTN* genes: association with breast cancer susceptibility and prognosis. *Breast Cancer Res. Treat.* **101**(1), 83–93.
- 15. Schneider B.P., Radovich M., Sledge G.W., Robarge J.D., Li L., Storniolo A.M., Lemler S., Nguyen A.T., Han-

cock B.A., Stout M., Skaar T., Flockhart D.A. (2008) Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer. *Cancer. Res. Treat.* **111**(1), 157–163.

- Beeghly-Fadiel A., Shu X.O., Lu W., Long J., Cai Q., Xiang Y.B., Zheng Y., Zhao Z., Gu K., Gao Y.T., Zheng W. (2011) Genetic variation in *VEGF* family genes and breast cancer risk: a report from the Shanghai breast cancer genetics study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 20(1), 33–41.
- Dorjgochoo T., Zheng Y., Gao Y.T., Ma X., Long J., Bao P., Zhang B., Wen W., Lu W., Zheng W., Shu X.O., Beeghly-Fadiel A. (2013) No association between genetic variants in angiogenesis and inflammation pathway genes and breast cancer survival among Chinese women. *Cancer Epidemiol.* 37(5), 619–624.
- 18. Косовец М.С., Дронова Т.А. (2019) Роль рецептора сосудисто-эндотелиального фактора роста II типа (VEGFR2) в прогрессировании эстрогензависимого рака молочной железы. Фундаментальная и клиническая онкология: достижения и перспективы развития. Российская научно-практическая конференция, посвященная 40-летию НИИ онкологии Томского НИМЦ. Под ред. Чойнзонова Е.Л., Чердынцевой Н.В., Чернова В.И. Томск: Изд-во Томского университета, С. 267.
- Lu D., Kussie P., Pytowski B., Persaud K., Bohlen P., Witte L., Zhu Z. (2000) Identification of the residues in the extracellular region of KDR important for interaction with vascular endothelial growth factor and neutralizing anti-KDR antibodies. J. Biol. Chem. 275, 14321–14330.
- Fuh G., Li B., Crowley C., Cunningham B., Wells J.A. (1998) Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 273, 11197–11204.
- Stuttfeld E., Ballmer-Hofer K. (2009) Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*. 61, 915– 922.
- 22. Yang Y., Xie P., Opatowsky Y., Schlessinger J. (2010) Direct contacts between extracellular membrane-proximal domains are required for VEGF receptor activation and cell signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 1906–1911.
- Zhang W.L., Sun K., Wang Y., Hu F.B., Hui R.T. American Heart Association (AHA) 2007 Scientific Sessions. (2007) Orlando, Florida. *Circulation*. 116(Suppl), P. 521. Abstract 2377.
- Matalliotaki C., Eliopoulos E., Matalliotakis M., Kalogiannidis I., Matalliotakis I., Spandidos D.A., Goulielmos G.N., Zervou M.I. (2019) Implication of VEG-FR2 in endometriosis: A structural biological and genetic approach. *World Acad. Sci. J.* 1, 283–289.
- Carmeliet P., Jain R.K. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 473(7347), 298–307.
- 26. Holderfield M.T., Hughes C.C. (2008) Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circ. Res.* **102**(6), 637–652.
- 27. Minami T., Rosenberg R.D., Aird W.C. (2001) Transforming growth factor-beta 1-mediated inhibition of the *Flk-1/KDR* gene is mediated by a 5'-untranslated

124

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

region palindromic GATA site. J. Biol. Chem. 276(7), 5395–5402.

- Higgins K.J., Liu S., Abdelrahim M., Yoon K., Vanderlaag K., Porter W., Metz R.P., Safe S. (2006) Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is induced by 17beta-estradiol in ZR-75 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins. *Endocrinology*. 147, 3285–3295.
- 29. Guo S., Colbert L.S., Fuller M., Zhang Y. (2010) Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1806**(1), 108–121.
- Bogin L., Degani H. (2002) Hormonal regulation of VEGF in orthotopic MCF7 human breast cancer. *Cancer Res.* 62(7), 1948–1951.
- Bordeaux J.M., Cheng H., Welsh A.W., Haffty B.J., Lannin D.R., Wu X., Su N., Ma X-J., Luo Y., Rimm D.L. (2012) Quantitative *in situ* measurement of estrogen receptor mRNA predicts response to tamoxifen. *PLoS One*. 7(5), e36559.
- 32. Kim C., Tang G., Pogue-Geile K.L., Costantino J.P., Baehner F.L., Baker J., Cronin M.T., Watson D., Shak S., Bohn O.L., Fumagalli D., Taniyama Y., Lee A., Reilly M.L., Vogel V.G., McCaskill-Stevens W., Ford L.G., Geyer C.E., Wickerham D.L., Wolmark N., Paik S. (2011) Estrogen receptor (ESR1) mRNA expression and benefit from tamoxifen in the treatment and prevention of estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 329(31), 4160–4167.

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 (VEGFR2) CONTRIBUTES TO THE TAMOXIFEN RESISTANCE IN ESTROGEN-POSITIVE BREAST CANCER PATIENTS

T. A. Dronova^{1, 2, *}, N. N. Babyshkina^{1, 2, 3}, M. V. Zavyalova^{1, 3}, E. M. Slonimskaya⁴, and N. V. Cherdyntseva^{1, 2}

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634009 Russia ²National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia ³Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

⁴St. Petersburg University, St Petersburg, 199034 Russia *e-mail: tanvadronova@mail.ru

Crosstalk between the estrogen receptors and the receptor tyrosine kinases, including vascular endothelial growth factor receptor type II (VEGFR2), is a key mechanism in the breast cancer resistance to antiestrogen therapy with tamoxifen. A high level of VEGFR2 expression in a tumor serves as a marker of tamoxifen resistance. The tamoxifen efficacy prognostic value of the functional polymorphisms in the *VEGFR2/KDR* gene has not been established. By qRT-PCR, we detected the rs2071559 and the rs2305948 variants and the levels of *KDR* gene expression in 122 breast tumor tissue samples from cohorts of patients with progression (distant metastases or relapse) and patients with no progression during tamoxifen therapy. Expression levels of VEG-FR2 protein were analyzed by immunohistochemistry. The frequency of heterozygous and mutant genotypes of rs2305948 SNP was significantly higher in patients without progression than that in cohort with progression. *KDR* rs2305948 was associated with high survival rates in breast cancer patients. A correlation between mRNA of the *ESR1* and *KDR* genes in patients without progression was detected. The results indicate the prognostic value of rs2305948 and its potential contribution to the tumor phenotype sensitive to tamoxifen.

Keywords: vascular endothelial growth factor receptor type II (VEGFR2), single nucleotide polymorphisms, gene expression, estrogen receptor, tamoxifen resistance, breast cancer

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 576.54

ОБРАБОТКА СТРОМАЛЬНЫХ СЛОЕВ МИТОМИЦИНОМ С СТИМУЛИРУЕТ ПОДДЕРЖАНИЕ КРОВЕТВОРЕНИЯ В СИСТЕМЕ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ in vitro

© 2021 г. О. Ф. Кандараков^{*a*}, Ю. В. Кравацкий^{*a*}, Н. С. Полякова^{*a*}, А. В. Брутер^{*a*}, Е. Г. Гордеева^{*a*}, А. В. Белявский^{*a*}, *

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

*e-mail: abelyavs@yahoo.com Поступила в редакцию 12.12.2019 г. После доработки 06.08.2020 г. Принята к публикации 13.08.2020 г.

Изучено влияние обработки митомицином С (МитС) стромальных слоев клеток NIH 3T3, экспрессирующих лиганд рецептора Notch Jagged1, на размножение гемопоэтических Lin(–) клеток костного мозга мышей в системе сокультивирования. Обработка стромальных клеток МитС существенно повышает число гемопоэтических клеток и частоту колониеобразующих клеток при культивировании на строме. Анализ транскриптомов контрольного и обработанного МитС препаратов стромы с помощью дифференциального РНК-секвенирования показал, что гены, экспрессия которых подавляется при обработке, преимущественно связаны с контролем пролиферации, клеточным циклом, сегрегацией хромосом и метаболизмом ДНК. Транскриптомный анализ, однако, не выявил индукции ключевых гемопоэтических цитокинов при действии МитС, что позволяет исключить такую индукцию в качестве основной причины стимуляции кроветворения на обработанной строме. В то же время список наиболее индуцируемых МитС генов содержит большое количество генов цитокинов/ростовых факторов и белков клеточной поверхности, которые, возможно, стимулируют поддержание кроветворения стромой, обработанной МитС. Продукты некоторых из этих генов, как показано ранее, непосредственно участвуют в экспансии гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток *in vitro* или *in vivo*.

Ключевые слова: митомицин C, стромальные клеточные слои, гемопоэтические клетки, Jagged1, LNGFR, транскриптомный анализ

DOI: 10.31857/S0026898421010080

введение

Подготовка стромальных слоев к культивированию гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток (ГСПК) зачастую включает этап обработки клеток стромы факторами, блокирующими их пролиферацию [1]. С этой целью применяют физические или химические методы подавления пролиферации клеток, к примеру, гамма-излучение или митомицин С (МитС) [2, 3]. Тем не менее, остается неясным, насколько важен этот этап для культивирования стволовых клеток на стромальном слое. В большинстве случаев культивирование ГСПК на стромальном слое проводят с использованием блокирования пролиферации [1]. С другой стороны, есть предположения, что блокировка пролиферации фидерных клеток может приводить к апоптозу и снижению продукции цитокинов и факторов роста клетками стромального слоя [4].

Согласно опубликованным результатам сравнительного культивирования эмбриональных стволовых клеток человека с фидерными эмбриональными фибробластами мыши (MEF), как контрольные, так и обработанные МитС MEF способны поддерживать продолжительную пролиферацию эмбриональных стволовых клеток, однако есть ограничения по плотности клеток фидерного слоя, не обработанных МитС [5]. Подобные сравнения проводили и с кератиноцитами, которые сокультивировали с аутологичными фибробластами и облученными клетками 3T3 мыши. Показано, что необлученные аутологичные фибробласты лучше поддерживают рост кератиноцитов, чем облученные клетки 3T3 [6].

Сокращения: MutC – митомицин C; LNGFR – низкоаффинный рецептор фактора pocta (low affinity nerve growth factor receptor); 3T3-J/L – NIH 3T3-Jagged1-LNGFR; ГСПК – гемопоэтические стволовые и прогениторные клетки; RNA-Seq – высокопроизводительное параллельное секвенирование PHK.

Очевидно, что исходные и обработанные МитС клетки стромального слоя могут различаться экспрессией генов, что повлияет на поддержание ГСПК при культивировании. Следует также иметь в виду, что отсутствие блокировки деления клеток стромального слоя может приводить к постепенному увеличению плотности слоя и, как следствие, к истощению среды, в которой культивируют ГСПК, что может негативно сказаться на параметрах их культивирования.

Поскольку отсутствует общепринятое мнение о влиянии блокирования пролиферации клеток стромы в системах сокультивирования, мы поставили задачу оценить параметры культивирования гемопоэтических клеток на интактных и обработанных МитС стромальных слоях и, при обнаружении значительных различий в результатах культивирования, провести сравнительный транскриптомный анализ контрольных и блокированных МитС стром.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. Lin(–) клетки костного мозга мыши получали из бедренных костей мышей линии C57Bl/6 при помощи набора Lineage depletion kit ("Miltenyi Biotec", Германия) по протоколу производителя.

Клетки GP293. NIH3T3 и 3T3-J/L культивировали в среде DMEM с 4.5 г/л глюкозы, 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 2 мМ глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 МЕ/мл пенициллина при 37°С и 5% СО₂ (далее DMEM). Клетки снимали раствором TrypLE Express ("Gibco", США). Собранные клетки центрифугировали при 150 g, супернатант удаляли и добавляли среду DMEM без сыворотки. Клетки обрабатывали 2.5 мкг/мл МитС в течение 2 ч в среде без сыворотки при 37°С и 5% СО2. Далее среду удаляли, клеточный монослой однократно промывали фосфатным буфером, затем добавляли полную среду DMEM и культивировали в течение 24 ч до внесения Lin(-) клеток. Перед внесением Lin(-) клеток на стромальный слой среду меняли на свежую. Клетки, не обработанные МитС, высевали в лунки шестилуночного планшета за сутки до внесения Lin(-) клеток и также меняли среду перед внесением Lin(-) клеток на стромальный слой. Начальная плотность клеток стромального слоя в исходном и обработанном МитС варианте составляла 10⁵ кл./см². Плотность посадки Lin(-) клеток $- 5 \times 10^3$ кл./см². Смену среды проводили через 2-3 сут. Исходные и обработанные МитС клетки стромального слоя для транскриптомного анализа культивировали в аналогичных условиях, но без внесения Lin(-) клеток. По окончании культивирования клетки лизировали Тризолом (Trizol Reagent, "Invitrogen", США). Клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра с использованием не менее трех независимых подсчетов для каждого образца. Клетки фотографировали камерой инвертированного микроскопа Olympus CKX41 с использованием фазового контраста.

Трансдукция клеток NIH 3T3-Jagged-LNGFR. Вирусный супернатант нарабатывали клетками упаковочной линии GP293 после кальций-фосфатной трансфекции клонированной бицистронной ретровирусной плазмидой, кодирующей Jagged и LNGFR. Для проведения трансдукции клетки NIH3T3 культивировали в течение 72 ч в среде, смешанной с вирусным супернатантом в соотношении 1 : 1, с добавлением полибрена (16 мкг/мл). Селекцию трансдуцированных клеток NIH 3T3-Jagged-LNGFR (3T3-J/L) проводили по поверхностному маркеру LNGFR с применением MACSelect[™] LNGFR MicroBeads ("Miltenyi Biotec"), следуя инструкциям фирмы-производителя.

Селекция гемопоэтических клеток. Разделение клеток стромального слоя 3T3-J/L и гемопоэтических клеток проводили на колонке LS ("Miltenyi Biotec"), установленной на MACS магните ("Miltenyi Biotec") после инкубации с 80 мкл MACSelect™ LNGFR MicroBeads ("Miltenyi Biotec"), следуя инструкциям фирмы-производителя. Выделенные гемопоэтические клетки культивировали в метилцеллюлозе MethoCult GF M3434 cat# 03434 ("StemCell Technologies", США) при 37°С и 5% CO₂ в течение 7–9 дней.

Подсчет колоний в метилцеллюлозе. Частоту колониеобразующих клеток в клеточных препаратах определяли в лунках 12-луночного планшета с 1 мл метилцеллюлозы, содержащей гемопоэтические факторы роста (MethoCult[™] GF M3434, "StemCell Technologies") и очищенные от магнитной стромы гемопоэтические клетки (10⁴). Анализ проводили в трех повторах для каждого варианта. Клетки культивировали в метилцеллюлозе в течение 9–10 дней при 37°С и 5% СО₂.

Транскриптомный анализ с помощью высокопроизводительного РНК-секвенирования. Транскриптомный анализ клеток стромального слоя проведен компанией "Геноаналитика" (Россия). Транскриптом каждого варианта анализировали в двух биологических повторностях, которые обрабатывали независимо. Суммарную РНК для транскриптомного анализа выделяли из клеток при помощи pearenta Trizol ("Thermo Fisher Scientific", США) согласно протоколу производителя. Качество и количество выделенной суммарной РНК проверяли на приборе BioAnalyser с использованием набора RNA 6000 Nano Kit ("Agilent", США). Далее выделяли поли(А)-фракцию РНК при помощи олигоТ-магнитных шариков с использованием набора Dynabeads® mRNA Purification Kit ("Ambion", $\Phi P\Gamma$) согласно инструкции изготовителя. Далее из поли(А)-РНК готовили



Рис. 1. Совмещенные графики некрашеных и окрашенных клеток стромального слоя 3T3-J/L антителами anti-Jagged1-AlexaFluor 647 (*a*) и anti-CD271-FITC (*b*).

библиотеки для массового параллельного секвенирования при помощи набора NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep ("NEB", США) согласно инструкции к набору. Концентрацию библиотек определяли при помощи набора Qubit dsDNA HS Assay Kit ("Thermo Fisher Scientific") на приборе Qubit 2.0. Распределение длин фрагментов библиотеки оценивали при помощи набора Agilent High Sensitivity DNA Kit ("Agilent"). Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500("Illumina", США) с генерацией не менее 10 млн коротких чтений длиной 50 нуклеотидов на реплику.

Биоинформатический анализ. Исходные чтения выравнивали на геном GRCm38 с помощью программы STAR (версия 2.5.3). Определение числа чтений, приходящихся на каждый ген (аннотация Ensembl v. 99), проводили с помощью программы htseq-count (версия 0.9.1). Количество чтений подсчитывали двумя методами: а) с использованием htseq-count по умолчанию; б) подсчет только чтений, полностью (100%) совпадающих с референсным геномом. Биоинформатический дифференциальный RNA-Seq-анализ проводили с помощью R-модуля DESeq2 [7]. Анализ генной онтологии (Gene Ontology, GO) проводили с использованием веб-сервера GOrilla [8].

Цитометрический анализ. Стромальные клетки 3T3-J/L окрашивали антителами anti-CD271-FITC ("BioLegend" (США) cat#345104, разведение 1 : 100), клетки 3T3-J/L перед окрашиванием anti-Jagged1-Alexa Fluor 647 (D4Y1R) ("Cell Signaling Technologies" cat#54340, разведение 1 : 50) фиксировали метанолом, следуя инструкции производителя антител. Выделенные гемопоэтические клетки красили антителами anti-CD45-APC ("BioLegend "cat#103112, разведение 1 : 200). Цитометрию проводили с помощью прибора BD LSRFortessa ("BD", США). Статистический анализ. Эксперименты с культивированием Lin(–) клеток (рис. 1–3) проводили не менее 3 раз, на рисунках показаны репрезентативные примеры. При проведении статистического анализа (вычисление стандартных отклонений и статистической значимости отличий по *t*-критерию Стьюдента) использовали статистические функции программы Excel ("Microsoft", США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия LNGFR и Jagged 1 трансдуцированными клетками стромального слоя NIH 3T3

Гемопоэтические клетки мыши, обогащенные ГСПК (фракция Lin⁻ клеток костного мозга), культивировали с использованием стромальных клеток NIH 3T3, экспрессирующих белок Jagged1 (трансмембранный лиганд рецептора Notch). Такие клетки значительно лучше поддерживают кроветворение in vitro, чем исходные, за счет активации сигнального пути Notch, что тормозит дифференцировку ГСПК [9]. Культивирование гемопоэтических клеток на стромальных слоях всегда сопряжено с задачей их последующего разделения. Ранее с этой целью мы использовали меченные магнитными наночастицами стромальные слои [10], что позволяло удалять из смеси клеток стромальный компонент. Однако последующие исследования показали, что стромальные клетки при культивировании теряют часть магнитной метки, что может ухудшать чистоту выделяемых гемопоэтических клеток [11]. Следовательно, необходимо было разработать эффективную систему отделения гемопоэтических клеток от клеток стромального слоя. Для выполнения этой задачи клетки NIH 3T3 трансдуцировали бицистронным ретровирусным вектором, кодирую-



Рис. 2. Рост Lin(–) клеток на исходном (*a*) и обработанном МитС (*б*) стромальном слое $3T_3$ -J/L, число гемопоэтических клеток, выделенных на 7-е сутки культивирования (*в*), и число колоний, сформированных в метилцеллюлозе (*г*). На диаграммах показаны средние значения и стандартные отклонения нормированных значений двух экспериментов. Число клеток и колоний нормировано относительно контрольных (не обработанных МитС) вариантов, принятых во всех экспериментах за единицу. Контроль и МитС – исходный и обработанный МитС стромальный слой соответственно. Клетки фотографировали с использованием фазового контраста. Планки на фотографиях соответствуют 100 мкм. На рис. 2*в* и 2*г p* < 0.05 (*) по сравнению с контролем (по *t*-критерию Стьюдента).



Рис. 3. Совмещенные графики контрольных и окрашенных антителами anti-CD45-APC гемопоэтических клеток, выделенных после 7 суток культивирования на контрольном (a) и обработанном МитС (b) стромальных слоях.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

щим гены Jagged1 и LNGFR (low affinity nerve growth factor receptor), где Jagged1 стимулировал пролиферацию гемопоэтических клеток, a LNGFR использовали для магнитной селекции клеток стромального слоя, как показано ранее [12, 13]. Доля клеток 3T3-J/L, экспрессирующих белки Jagged1 и LNGFR после магнитной селекции с применением MACSelect[™] LNGFR MicroBeads, превышала 99% (рис. 1), что доказывает высокую эффективность магнитной селекции трансдуцированных клеток по LNGFR с применением данного подхода. Инкубация смеси стромальных 3T3-J/L и гемопоэтических клеток с магнитномечеными антителами с последующим разделением на колонке LS Miltenyi Biotec позволяет отделять стромальные клетки, экспрессирующие LNGFR, от гемопоэтических клеток.

Культивирование гемопоэтических клеток на строме 3T3-J/L

Гемопоэтические клетки культивировали на подготовленных стромальных слоях 3T3-J/L. Оказалось, что гемопоэтические клетки формируют колонии только на стромальном слое, обработанном МитС, в то время как в контрольном варианте такие колонии практически не встречались (рис. 2a, δ). Однако различия касались не только колоний гемопоэтических клеток на стромальном слое, но и числа клеток с этих стромальных слоев. Наибольшее количество клеток выделено со стромального слоя, обработанного МитС (рис. 26). Различие между гемопоэтическими клетками, выделенными с разных стромальных слоев, коснулось и числа колониеобразующих клеток в метилцеллюлозе. Число колоний, которые сформировали гемопоэтические клетки, снятые с обработанного МитС слоя, было значительно больше, чем с контрольного варианта (рис. 2г).

Мы также охарактеризовали цитометрически снятые со стромальных слоев клетки по пан-гемопоэтическому маркеру CD45. В популяции выделенных Lin(-) клеток доля CD45-позитивных клеток составляла 85%. При культивировании Lin(-) клеток на обработанном МитС стромальном слое доля CD45-позитивных клеток осталась высокой и составила 80%, при этом в популяции клеток, снятых с необработанного МитС стромального слоя, эта доля была несколько ниже (около 60%, рис. 3), однако значимость различий между контрольными и обработанными МитС культурами остается неясной. В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что в клеточных популяциях, снятых со стромальных слоев, большинство составляют CD45-позитивные гемопоэтические клетки.

Анализ транскриптома стромальных клеток

Поскольку стромальные слои, обработанные МитС, обладают существенно более высокой способностью поддерживать кроветворение, чем контрольные слои, мы предположили, что обработка вызывает в стромальных клетках стресс-ответ, включающий, в том числе, активацию экспрессии генов гемопоэтических цитокинов, таких, как Kitl или Thpo. Для проверки этого предположения, а также для идентификации других возможных изменений в паттерне генной экспрессии, проведен транскриптомный анализ клеток стромального слоя до и после обработки МитС. С этой целью применили метод глубокого секвенирования RNA-Seq с использованием более 10 млн чтений на реплику. Анализ качества чтений реплик и их согласованности показал высокое качество чтений (Q > 30 для всех нуклеотидов в чтениях во всех репликах) и высокую согласованность реплик (коэффициент корреляции Пирсона для каждой пары реплик. вычисленный программой deepTools, r = 0.99). Возможную роль дифференциально экспрессирующихся генов исследовали с использованием GO-анализа с помощью веб-сервера Gorilla [8]. Результаты GO-анализа генов, экспрессия которых подавляется при обработке стромальных клеток МитС, приведены на рис. 4. Среди генов с высокой степенью подавления экспрессии широко представлены гены, продукты которых участвуют в пролиферации, регуляции клеточного цикла и сегрегации хромосом. Среди этих генов также широко представлены гены. участвующие в метаболизме ДНК, которые не вошли в схему, представленную на рис. 46, из-за высокого порога отсечения (10⁻¹¹).

Что касается генов, экспрессия которых индуцируется при обработке МитС, то, вопреки первоначальной гипотезе, не обнаружено заметной индукции генов, кодирующих известные гемопоэтические цитокины – как ранние (в частности, KitL, Tpo, Flt3L), так и поздние (Csf1, Csf2, Csf3). Единственное исключение представляет интерлейкин-6, экспрессия которого индуцируется в 3.8 раза при обработке МитС, однако уровень его экспрессии даже после индукции, если судить по числу чтений (18-20 на 10 млн), остается относительно низким. Анализ GO класса "процесс" (рис. 5а) выявил некоторые группы, с высокой степенью значимости обогащенные в списке индуцируемых генов, однако их связь с поддержанием кроветворения представляется неясной. Тем не менее, GO-анализ классов "функция" (рис. 56) и "компонент" (рис. 5*в*) выявил обогащение генами, связанными с взаимодействиями лиганд-рецептор, с компонентами клеточной мембраны и внеклеточного пространства соответственно.

Проведен анализ 40 генов с наиболее высокой степенью индукции (табл. 1), направленный на исследование их возможной связи с кроветворе-



Рис. 4. Иерархическая блок-схема терминов GO (генной онтологии) для генов с наиболее высоким уровнем подавления экспрессии после обработки стромальных клеток МитС. a – Схема класса GO "процесс"; δ – схема класса GO "компонент". При построении схем использовали пороги отсечения 10^{-11} и 10^{-6} – a и δ соответственно. Гены с низким уровнем экспрессии из анализа исключены.



Рис. 5. Иерархическая блок-схема терминов GO генов с наиболее высоким уровнем индукции экспрессии после обработки стромальных клеток МитС. a – Схема класса GO "процесс"; δ – схема класса GO "функция"; e – схема класса GO "компонент". При построении схем использованы пороги отсечения 10^{-6} , 10^{-4} и 10^{-3} (части a, δ и e соответственно). Гены с низким уровнем экспрессии из анализа исключены.

Офици- альное название	Полное название	Степень индукции экспрессии, log ₂	Уровень экспрессии, ТРМ*	р	Поверхнос- тный/ секре- тируемый белок?	Комментарий*
Gm 10800		3.53	2472.6	2.38E-08	н.п.	Предположительно, некодирующая РНК, функция неизвестна
Gm 10801		3.53	654.6	2.07E-16	н.п.	Предположительно, некодирующая РНК, функция неизвестна
Agt	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	3.37	16.3	1.09E-14	Да	
Ccl8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	2.96	14.6	0.0002	То же	Хемокин, участвует в стимуляции хоуминга ГСПК к стромальным клеткам
Serpina3i	Serine (or cysteine) pepti- dase inhibitor, clade A, member 3I	2.95	19.80	0.0004	»	Способствует экспан- сии ГСПК
CD80	CD80 antigen	2.70	64.7	5.37E-48	»	
Klra2	Killer cell lectin-like recep- tor, subfamily A, member 2	2.57	15.3	7.68E-08		
Prl2c3	Prolactin family 2, subfam- ily c, member 3	2.52	484.6	1.85E-25	»	Способствует экспан- сии ГСПК
Ccn5	Cellular communication network factor 5	2.47	28.2	4.36E-12	»	Цитокин/фактор роста
Id2	Inhibitor of DNA binding 2	2.24	54.5	4.32E-19	Нет	Способствует экспан- сии ГСПК
Tnnt2	Troponin T2, cardiac	2.14	17.9	3.38E-06	То же	
Id3	Inhibitor of DNA binding 3	2.09	108.6	7.41E-27	»	Способствует экспан- сии ГСПК
Aldh3a1	Нет	1.98	289.0	1.17E-76	»	Роль в регуляции числа ГСПК
Lcn2	Lipocalin 2	1.93	30.8	5.36E-08	Да	Роль в регуляции числа ГСПК
Des	Desmin	1.85	15.8	4.83E-07	Нет	
Kazald 1	Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 1	1.83	26.0	9.72E-10	Да	
Serpina3h	Serine (or cysteine) pepti- dase inhibitor, clade A, member 3h	1.83	20.8	0.0004	Да	Способствует экспан- сии ГСПК
Thbs1	Thrombospondin 1	1.77	42.9	4.35E-42	Да	
Trp53inp1	Transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	1.75	62.3	6.66E-55	Нет	

Таблица 1. Гены с наиболее сильной индукцией экспрессии после обработки стромальных клеток митомицином С

Офици- альное название	Полное название	Степень индукции экспрессии, log ₂	Уровень экспрессии, ТРМ*	р	Поверхнос- тный/ секре- тируемый белок?	Комментарий*
Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	1.74	131.0	4.24E-39	То же	
Snora2b	Small nucleolar RNA, H/ACA box 2B	1.65	105.3	0.0003	»	
H2bc4	H2B clustered histone 4	1.60	16.7	0.003	»	
C4b	Complement component 4B	1.62	105.9	1.09E-48	Да	
Dusp4	Dual specificity phospha- tase 4	1.54	24.6	3.49E-11	Нет	
Prl2c2	Prolactin family 2, subfam- ily c, member 2	1.48	350.7	1.39E-07	Да	Вероятно, способствует экспансии ГСПК
Nrp1	Neuropilin 1	1.47	37.7	1.46E-21	Да	
Id1	Inhibitor of DNA binding 1	1.46	141.5	2.23E-20	Нет	
Sdc1	Syndecan 1	1.43	184.4	1.69E-47	Да	
Gm2115		1.42	18.5	1.94E-15	н.п.	
Gm5886		1.40	390.9	7.73E-28	н.п.	
Btg2	BTG anti-proliferation fac- tor 2	1.38	44.7	1.54E-17	Нет	
Tmem268	Transmembrane protein 268	1.36	21.1	4.80E-09	Да	
Eda2r	Ectodysplasin A2 receptor	1.35	35.5	5.47E-18	Да	
Ahr	Aryl-hydrocarbon receptor	1.33	28.0	2.39E-14	Нет	Роль в функциониро- вании ГСПК
Lgi4	Leucine-rich repeat LGI family, member 4	1.33	33.6	9.68E-16	Да	
Cyp1b1	Cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	1.32	21.3	1.64E-13	Нет	
Serpinb9b	Serine (or cysteine) pepti- dase inhibitor, clade B, member 9b	1.32	22.8	2.63E-07	Да	
Crlf1	Cytokine receptor-like fac- tor 1	1.31	306.3	8.49E-38	Да	
Spag1	Sperm associated antigen 1	1.29	20.2	1.53E-07	Нет	
Slpi	Secretory leukocyte pepti- dase inhibitor	1.27	648.8	1.17E-40	Да	Способствует экспан- сии ГСПК

Таблица 1. Продолжение

* Подробности в разделе "Обсуждение результатов".

Примечание. ТРМ (transcripts per million) – число транскриптов данного гена на миллион транскриптов в клеточном препарате. н.п. – не применимо.

нием и поддержанием ГСПК. При этом в анализ были включены только гены со средним и высоким уровнем экспрессии, поскольку функциональная значимость генов с низким уровнем экспрессии в наблюдаемых эффектах стромы представляется сомнительной. Приведенные в табл. 1 данные показывают, что среди проанализированных генов высокая доля (более 50%) принадлежит генам, кодирующим белки, либо локализованные на клеточной поверхности, либо секретируемые в среду, что согласуется с результатами GO-анализа класса "компонент". Белки этой группы могут непосредственно участвовать в передаче сигналов от стромы к ГСПК и, вероятно, некоторые из них могут активировать пролиферацию ГСПК после обработки стромы МитС. Как отмечено в табл. 1, продукты некоторых из исследованных генов способствуют экспансии ГСПК *in vitro* и *in vivo*. Более подробно влияние этих генов на кроветворение рассмотрено в разделе "Обсуждение результатов".

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сравнение результатов культивирования Lin(-) клеток на стромальных слоях 3T3-J/L, обработанных и не обработанных МитС, выявило значительные различия в числе гемопоэтических клеток, частоте колониеобразующих клеток и уровне экспрессии поверхностного маркера CD45. Известно, что разные стромальные слои способны по-разному поддерживать рост стволовых клеток, и причина этого различия, по всей вероятности, лежит в различиях паттернов экспрессии генов [14]. С другой стороны, обработка клеток МитС также меняет спектр и уровень экспрессии генов [15-17]. По данным транскриптомного анализа, проведенного в настоящей работе, обработка клеток стромального слоя МитС также вызывает значительные изменения генной экспрессии. Подобные изменения паттерна экспрессии являются наиболее вероятным механизмом увеличения поддержания кроветворения in vitro стромальными слоями после такой обработки. Однако на ланный момент нельзя полностью исключить и альтернативный механизм, связанный с тем, что, по нашим наблюдениям, клетки NIH 3T3 не полностью подвержены контактному торможению в условиях монослоя и продолжают рост при достижении полного монослоя. В отсутствие обработки МитС это приводит к мало контролируемой пролиферации стромальных клеток и к ускоренному поглощению стромой питательных веществ в среде, что, в свою очередь, может ограничивать питание сокультивируемых кроветворных клеток и замедление их пролиферации. С таким объяснением, однако, не согласуется визуальный анализ процесса сокультивирования на строме, согласно которому различия в продукции кроветворных клеток на контрольной строме и строме, обработанной МитС, начинают проявляться уже в первые дни культивирования, когда плотность стромального слоя в контроле и при обработке МитС не сильно различается.

Следует отметить, что наборы генов, экспрессиия которых подавляется или индуцируется обработкой МитС, функционально сильно различаются. По данным GO-анализа для первой категории характерно доминирование генов, которые позитивно регулируют клеточный цикл, в том числе и расхождение хромосом. Очевидно, клетка снижает экспрессию тех генов, функция которых становится ненужной при блокировании пролиферации вследствие обработки МитС. Сходные изменения в экспрессии генов, связанных с пролиферацией, клеточным циклом и хромосомной сегрегацией, обнаружены ранее при обработке МитС нейральных стволовых клеток [17].

Весьма отчетливо функциональные различия между генами, экспрессия которых подавляется или, наоборот, индуцируется при обработке стромы МитС, выявляются при GO-анализе категории "компонент". Если для первых характерно обогащение генами, связанными с хромосомами, кинетохорами и митотическим веретеном, то для последних характерно обогащение генами, связанными с клеточной мембраной и внеклеточным пространством, в том числе с внеклеточным матриксом.

Транскриптомный анализ показал, что, с одной стороны, не подтвердилась первоначальная гипотеза об индукции генов известных гемопоэтических цитокинов при обработке стромы МитС. Единственное исключение здесь составляет интерлейкин-6, уровень которого в обработанной МитС строме возрастает в 3.8 раза, однако низкий уровень этого цитокина даже после индукции заставляет сомневаться в его существенной роли в эффектах стромы, обработанной МитС.

Тем не менее, список генов со средним и высоким уровнем экспрессии, которые наиболее сильно индуцируются МитС, обогащен генами белков, локализованных на клеточной поверхности, и секретируемых цитокинов/ростовых факторов. Детальный анализ доступных опубликованных данных показал, что некоторые из этих белков играют существенную роль в кроветворении и экспансии ГСПК, т.е. они могут отвечать за стимуляцию кроветворения на строме при обработке МитС. В частности, высокая экспрессия и высокий уровень индукции (в 5.7 раза) отмечены у гена Prl2c3 (пролиферин-2), продукт которого, как показано ранее, стимулирует экспансию ГСПК *ex vivo* [18]. Высокий уровень экспрессии и значительная степень индукции обнаружены также у родственного гена Prl2c2 (пролиферин), который, судя по высокой идентичности на уровне белка с Prl2c3, должен обладать сходной функцией. Еще более высокая степень индукции (в 7.8 раза), хотя и при умеренном уровне транскрипции, обнаружена у гена хемокина Ccl8. Продукт этого гена вместе с хемокином Cxcl12 участвует в стимуляции хоуминга ГСПК к стромальным клеткам [19]. Кроме того, высокая степень индукции (в 5.5 раза) при умеренном уровне транскрипции характерна для гена *Ccn5 (WISP2*), принадлежащего к семейству факторов роста Ccn (cellular communication network factors). Следует отметить, что гены еще двух членов семейства Ccn, а именно Ccn2 и Ccn3, не вошедшие в исследуемый список, индуцируются не менее чем в 2 раза при обработке стромальных клеток МитС. Продукты этих генов, как показано ранее, участвуют непосредственно в экспансии ГСПК [20, 21]. Возможно, подобной функцией обладает и ген Ссп5. Показано, что сверхэкспрессия в костной ткани высоко индуцируемого гена липокалина 2 (Lcn2) вызывает увеличение числа ГСПК in vivo [22]. Обращает также на себя внимание, что среди 40 генов с наиболее высокой степенью индукции присутствуют четыре гена, кодирующих ингибиторы протеаз (Serpina3i, Serpina3h, Slpi и Serpinb9b). Первые три гена способствуют экспансии кроветворных клеток за счет ингибирования протеолиза гемопоэтических цитокинов согласно [23, 24].

Хотя рассмотренные гены кодируют секретируемые белки, которые, функционируя как факторы роста, могут непосредственно стимулировать пролиферацию ГСПК, в число генов с высокой степенью индукции входит также ряд генов, кодируюших питоплазматические/ялерные белки. в частности факторы транскрипции. За последние годы надежно установлено, что клетки могут оказывать значительное воздействие друг на друга путем обмена секретируемыми внеклеточными везикулами — экзосомами и родственными образованиями. При этом, в отличие от классического взаимодействия клеток с использованием секретируемых факторов, внеклеточные везикулы содержат цитоплазматические белки, а также РНК, в том числе и матричные, которые могут передаваться клеткамреципиентам. В этой связи важно упомянуть, что из четырех генов семейства факторов транскрипции Id (inhibitor of DNA binding) три (Id1, Id2 и Id3) показали средний или высокий уровень экспрессии и высокую степень индукции при обработке МитС. Вполне возможно, что это генное семейство играет значительную роль в выполнении программы индукции и/или подавлении экспрессии генов МитС. В контексте этой работы весьма важны данные, показывающие, что сверхэкспрессия Id2 в ГСПК способствует их экспансии *in vitro* примерно в 10 раз [25], а при сверхэкспрессии Id3 экспансия ГСПК происходит в еще более значительной степени [26]. Таким образом, можно предположить, что обработанные МитС стромальные клетки могут способствовать размножению ГСПК, в том числе и за счет экспорта РНК и/или белков семейства Id посредством экзосом. Ранее было показано, что ген фактора транскрипции Ahr (aryl-hydrocarbon receptor), существенно индуцируемый МитС, играет важную роль в ГСПК [27]. Более того, экспрессия Ahr в стромальных клетках также важна для функционирования ГСПК [28]. Интересно, что альдегиддегидрогеназа 3a1 (Aldh3a1), уровень экспрессии который повышается при индукции в 4 раза,

участвует в регуляции числа ГСПК, предположительно, за счет регуляции образования активных форм кислорода и реактивных альдегидов [29].

Обрашает на себя внимание, что в списке высоко экспрессируемых индуцируемых генов два первых места по уровню индукции занимают гены, получившие в базе ENSEMBL названия Gm10800 и Gm10801. В базе ENSEMBL они представлены как гены, кодирующие трансмембранные белки с пятью гидрофобными доменами, однако это чисто теоретическая классификация, которая не имеет экспериментального подтверждения. Анализ предсказанных РНК этих генов выявляет ряд свойств, не характерных для классических белокколирующих РНК. в частности, у них отсутствуют 5'- и 3'-некодирующие области и даже терминирующий кодон, они также имеют необычно короткие (вплоть до одного основания) некоторые интроны. Мы предполагаем, что представленные в базе ENSEMBL последовательности РНК Gm10800 и Gm10801 могут быть результатом некорректного предсказания экзон-интронной структуры этих генов, а соответствующие им РНК на самом деле являются некодирующими, поскольку с использованием метода ОТ-ПЦР мы не смогли обнаружить в стромальных клетках РНК с предсказанной последовательностью (данные не приведены). При этом в геноме мыши найден целый ряд участков с родственными последовательностями (не менее 13 в общей сложности). По всей вероятности, транскрипция некоторых из этих участков происходит в стромальных клетках, индуцируется при обработке МитС и, возможно, имеет функциональное значение, однако точная последовательность соответствующих РНК и, тем более, их гипотетическая функция не установлены.

Авторы благодарят компанию "Геноаналитика" (Москва) за профессионально проведенный транскриптомный анализ и первичную биоинформатическую обработку данных.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-14-00300).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Llames S., García-Pérez E., Meana Á., Larcher F., del Río M. (2015) Feeder layer cell actions and applications *Tissue Eng. Part B Rev.* 21, 345–353.
- 2. Roy A., Krzykwa E., Lemieux R., Néron S. (2001) Increased efficiency of gamma-irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term cultures. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **10**, 873–880.

- 3. Chugh R.M., Chaturvedi M., Yerneni L.K. (2015) An evaluation of the choice of feeder cell growth arrest for the production of cultured epidermis. *Burns.* **41**, 1788–1795.
- Glettig D.L., Kaplan D.L. (2013) Extending human hematopoietic stem cell survival *in vitro* with adipocytes. *Biores. Open Access.* 2, 179–185.
- Xie C.Q., Lin G., Yuan D., Wang J., Liu T.C., Lu G.X. (2005) Proliferative feeder cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells. *Cell Biol. Int.* 29, 623–628.
- Jubin K., Martin Y., Lawrence-Watt D.J., Sharpe J.R. (2011) A fully autologous co-culture system utilising nonirradiated autologous fibroblasts to support the expansion of human keratinocytes for clinical use. *Cytotechnology*. 63, 655–662.
- Love M.I., Huber W., Anders S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Eden E., Navon R., Steinfeld I., Lipson D., Yakhini Z. (2009) GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*. 10, 48.
- Раевская А.А., Савватеева М.В., Бухинник С.С., Кандараков О.Ф., Бутылин П.А., Жук С.В., Демин А.М., Краснов В.П., Зарицкий А.Ю., Белявский А.В. (2017) Культивирование кроветворных предшественников мыши и человека на стромальных подслоях, экспрессирующих лиганды Notch. Молекуляр. биология. 51(2), 356–366.
- Savvateeva M.V., Demin A.M., Krasnov V.P., Belyavsky A.V. (2016) Magnetic stromal layers for enhanced and unbiased recovery of co-cultured hematopoietic cells. *Anal. Biochem.* 509, 146–155.
- Кандараков О.Ф., Дёмин А.М., Попенко В.И., Леонова О.Г., Копанцева Е.Е., Краснов В.П., Белявский А.В. (2020) Факторы, влияющие на мечение клеток NIH 3T3 магнитными наночастицами. *Молекуляр. биология.* 54(1), 114–127.
- Fehse B., Uhde A., Fehse N., Eckert H.G., Clausen J., Rüger R., Koch S., Ostertag W., Zander A.R., Stockschläder M. (1997) Selective immunoaffinitybased enrichment of CD34+ cells transduced with retroviral vectors containing an intracytoplasmatically truncated version of the human low-affinity nerve growth factor receptor (deltaLNGFR) gene. *Hum. Gene Ther.* 8(15), 1815–1824.
- Hildinger M., Schilz A., Eckert H.G., Bohn W., Fehse B., Zander A., Ostertag W., Baum C. (1999) Bicistronic retroviral vectors for combining myeloprotection with cell-surface marking. *Gene Ther.* 6, 1222–1230.
- Kueh J., Richards M., Ng S.W., Chan W.K., Bongso A. (2006) The search for factors in human feeders that support the derivation and propagation of human embryonic stem cells: preliminary studies using transcriptome profiling by serial analysis of gene expression. *Fertil. Steril.* 85, 1843–1846.
- 15. Stepp M.A., Pal-Ghosh S., Tadvalkar G., Li L., Brooks S.R., Morasso M.I. (2018) Molecular basis of

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

mitomycin C enhanced corneal sensory nerve repair after debridement wounding. *Sci. Rep.* **8**, 16960.

- Sato N., Haga J., Anazawa T., Kenjo A., Kimura T., Wada I., Mori T., Marubashi S., Gotoh M. (2017) *Ex vivo* pretreatment of islets with mitomycin c: reduction in immunogenic potential of islets by suppressing secretion of multiple chemotactic factors. *Cell Transplant.* 26, 1392–1404.
- Felfly H., Xue J., Zambon A.C., Muotri A., Zhou D., Haddad G.G. (2011) Identification of a neuronal gene expression signature: role of cell cycle arrest in murine neuronal differentiation *in vitro. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **301**, R727–R745.
- Choong M.L., Tan A.C., Luo B., Lodish H.F. (2003) A novel role for proliferin-2 in the *ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells. *FEBS Lett.* 550, 155–162.
- Nguyen Hoang A.T., Liu H., Juaréz J., Aziz N., Kaye P.M., Svensson M. (2010) Stromal cell-derived CXCL12 and CCL8 cooperate to support increased development of regulatory dendritic cells following *Leishmania* infection. J. Immunol. 185, 2360–2371.
- Istvánffy R., Vilne B., Schreck C., Ruf F., Pagel C., Grziwok S., Henkel L., Prazeres da Costa O., Berndt J., Stümpflen V., Götze K.S., Schiemann M., Peschel C., Mewes H.W., Oostendorp R.A.J. (2015) Stroma-derived connective tissue growth factor maintains cell cycle progression and repopulation activity of hematopoietic stem cells *in vitro*. *Stem Cell Repts*. 5, 702–715.
- Gupta R., Hong D., Iborra F., Sarno S., Enver T. (2007) NOV (CCN3) functions as a regulator of human hematopoietic stem or progenitor cells. *Science*. 316, 590–593.
- Costa D., Principi E., Lazzarini E., Descalzi F., Cancedda R., Castagnola P., Tavella S. (2017) LCN2 overexpression in bone enhances the hematopoietic compartment via modulation of the bone marrow microenvironment. J. Cell. Physiol. 232, 3077–3087.
- Winkler I.G., Hendy J., Coughlin P., Horvath A., Lévesque J.P. (2005) Serine protease inhibitors serpinal and serpina3 are down-regulated in bone marrow during hematopoietic progenitor mobilization. *J. Exp Med.* 201, 1077–1088.
- Goselink H.M., Hiemstra P.S., van Noort P., Barge R.M., Willemze R., Falkenburg J.H. (2006) Cytokine-dependent proliferation of human CD34+ progenitor cells in the absence of serum is suppressed by their progeny's production of serine proteinases. *Stem Cells.* 24, 299– 306.
- van Galen P., Kreso A., Wienholds E., Laurenti E., Eppert K., Lechman E.R., Mbong N., Hermans K., Dobson S., April C., Fan J.B., Dick J.E. (2014) Reduced lymphoid lineage priming promotes human hematopoietic stem cell expansion. *Cell Stem Cell.* 14, 94–106.
- 26. Ikawa T., Masuda K., Huijskens M.J.A.J., Satoh R., Kakugawa K., Agata Y., Miyai T., Germeraad W.T.V., Katsura Y., Kawamoto H. (2015) Induced developmental arrest of early hematopoietic progenitors leads to the

generation of leukocyte stem cells. *Stem Cell Repts.* 5, 716–727.

- 27. Lindsey S., Papoutsakis E.T. (2012) The evolving role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the normo-physiology of hematopoiesis. *Stem Cell Rev. Rep.* **8**, 1223–1235.
- 28. Bennett J.A., Singh K.P., Welle S.L., Boule L.A., Lawrence B.P., Gasiewicz T.A. (2018) Conditional deletion

of Ahr alters gene expression profiles in hematopoietic stem cells. *PLoS One.* **13**, e0206407.

 Gasparetto M., Sekulovic S., Brocker C., Tang P., Zakaryan A., Xiang P., Kuchenbauer F., Wen M., Kasaian K., Witty M.F., Rosten P., Chen Y., Imren S., Duester G., Thompson D.C., Humphries R.K., Vasiliou V., Smith C. (2012) Aldehyde dehydrogenases are regulators of hematopoietic stem cell numbers and B-cell development. *Exp. Hematol.* 40, 318–329.

TREATMENT OF STROMAL LAYERS WITH MITOMYCIN C STIMULATES SUPPORT OF HEMATOPIESIS *IN VITRO* IN A CO-CULTURE SYSTEM

O. F. Kandarakov¹, Y. V. Kravatsky¹, N. S. Polyakova¹, A. V. Bruter¹, E. G. Gordeeva¹, and A. V. Belyavsky^{1, *}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia *e-mail: abelyavs@yahoo.com

Effects of mitomycin C (MitC) treatment of stromal layers of NIH 3T3 cells expressing Jagged1, a Notch receptor ligand, on growth of hematopoietic Lin(–) mouse bone marrow fraction in a co-culture system were studied. Treatment of stromal cells with MitC significantly increases the number of hematopoietic cells and the frequency of colony-forming cells in stromal co-cultures. Transcriptome analysis of control and MitC-treated stromal cell samples using differential RNA sequencing demonstrated that genes whose expression is suppressed after treatment are predominantly associated with control of proliferation, cell cycle, chromosome segregation and DNA metabolism. Transcriptome analysis, however, did not reveal induction of key hematopoietic cytokines upon MitC action, which excludes this as a main reason of activation of hematopoiesis on the treated stroma. At the same time, the list of the genes most highly induced by MitC treatment is enriched with genes of cytokines/growth factors and cell surface proteins that, presumably, stimulate enhanced hematopoiesis support on MitC-treated stroma. Products of some of these genes were previously shown to have a role in expansion of hematopoietic stem/progenitor cells *in vitro* or *in vivo*.

Keywords: mitomycin C, stromal cell layers, hematopoietic cells, Jagged1, LNGFR, transcriptome analysis

—— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 621.017.1:616-006

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *САSC5* КОРРЕЛИРУЕТ С ТАРГЕТНЫМИ МУТАЦИЯМИ ПРИ ЛЕЙКОЗЕ

© 2021 г. К. В. Богданов^{а,} *, О. В. Мерзликина^а, Ю. В. Миролюбова^а, Л. Л. Гиршова^а, Э. Г. Ломаиа^а, А. Ю. Зарицкий^а

^а Научно-исследовательский институт онкологии и гематологии Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, 197341 Россия

**e-mail: kvbogdanov@yandex.ru* Поступила в редакцию 21.02.2020 г. После доработки 31.07.2020 г. Принята к публикации 13.08.2020 г.

Нарушение функции генов, контролирующих митоз и ответственных за правильное расхождение сестринских хроматид в анафазе, часто сопровождается анеуплоидией, нередко выявляемой при лейкозах. Важным фактором, обеспечивающим корректное связывание прицентромерной области хромосом с микротрубочками веретена деления, является один из компонентов кинетохорного комплекса, а именно, белок AF15q14/KNL1/CASC5. Как показано недавно, при некоторых лейкозах ген этого белка может вовлекаться в образование хромосомной транслокации t(11;15)(q23;q14) или варианта химерного онкогена MLL-AF15Q14, что служит биомаркером плохого прогноза. Несмотря на участие мРНК гена CASC5 в онкогенезе солидных опухолей, экспрессия этого гена при злокачественных новообразованиях кроветворной системы не изучена. Нами проведен анализ уровней экспрессии гена CASC5 и ближайшего круга регуляторных генов, включая WT1, APOBEC3A (A3A), *N-МYC.* Обнаружено выраженное снижение экспрессии *CASC5* в клетках костного мозга первичных больных лейкозом по сравнению со здоровыми донорами. Показано также, что пониженная экспрессия гена CASC5 коррелирует с выявлением таргетных мутаций у пациентов, относящихся к двум прогностическим подгруппам (благоприятная, неблагоприятная), с уровнем значимости (p < 0.05). Отмечено, что изменение уровня экспрессии гена CASC5 при остром миелоидном лейкозе ассоциировано со сверхэкспрессией генов WT1, A3A, а в некоторых случаях с N-MYC и SPT16, что согласуется с устойчивостью к полихимиотерапии и прогрессией лейкоза. Однако вопрос о том, какой из геноврегуляторов инициирует лейкемогенез, остается открытым.

Ключевые слова: лейкоз, онкогены, мутации, регуляция, экспрессия, *CASC5*, *WT1*, *A3A*, *N-MYC* **DOI:** 10.31857/S002689842101002X

введение

Причины развития лейкоза и его прогрессии остаются во многих случаях неизвестными. Тем не менее, за последнее десятилетие появились данные о вовлеченности в эти процессы не только известных таргетных онкогенов, мутации в которых часто ассоциированы с прогнозом течения и исходом заболевания, но и менее изученных генов-регуляторов, комплексная роль которых в опухолевом процессе только начинает проясняться. К генам-регуляторам относятся гены факторов, контролирующих различные процессы, в частности митоз, а также предшествующие митозу события, такие как репликация, транскрипция, репарация, программированная клеточная гибель и др. В число генов-регуляторов входит ген AF15Q14/CASC5/KNL1, белок-продукт которого связывает прицентромерные области хромосом и входит в состав кинетохорного комплекса. Белок AF15Q14/CASC5/KNL1 принимает участие в присоединении микротрубочек веретена деления к центромерам сестринских хроматид в метафазе и способствует их правильному расхождению в дочерние клетки в анафазе митоза. Впервые вклад гена AF15Q14/CASC5/KNL1 в возникновение злокачественных новообразований кроветворной системы показали после обнаружения слитого онкогена MLL-AF15Q14, который образуется в результате хромосомной транслокации t(11;15)(q23;q14) при миелодиспластическом синдроме (МДС), а также при некоторых лейкозах, включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ (М2, М4, М5)) и Т-клеточный острый лимфобластный

Сокращения: В-ОЛЛ – В-клеточный острый лимфобластный лейкоз; Т-ОЛЛ – Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз; МДС – миелодиспластический синдром; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз.

лейкоз (Т-ОЛЛ) как у детей, так и у взрослых [1–4]. Наличие клеток, несущих эту перестройку, свидетельствует, как правило, о плохом прогнозе заболевания.

Кроме того, в гене *CASC5* найдены точечные мутации *CASC5*^{c.6125G>A} и *CASC5*^{c.6560A>G}, первоначально обнаруженные при наследственной микроцефалии (МСРН4), а также мутация *CASC5*^{T142R}, вовлеченная (вместе с соматическими изменениями в других генах) в клональную эволюцию хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) [5, 6]. Эти мутации способствуют нарушению локализации белков ZWINT1, MIS12, BUB3 в составе кинетохорного комплекса, что коррелирует с потерей контроля над присоединением микротрубочек веретена деления к центромерам и приводит к неправильной сегрегации хромосом в митозе.

Вместе с тем, об экспрессии гена AF15Q14/ *CASC5/KNL1* или кодируемого им белка AF15q14/ CASC5/KNL1 известно не слишком много. Так. недавно показано, что изменение экспрессии гена CASC5 и/или белка CASC5 при некоторых солидных опухолях, включая рак легкого, цервикальный рак и рак толстой кишки, ассоциировано с повышением клеточной пролиферации [7–9]. Одновременно с этим отмечено увеличение экспрессии CASC5 в клеточной линии Jurkat (Т-ОЛЛ) [7]. Тем не менее, изменение экспрессии гена CASC5 при онкогематологических заболеваниях до сих пор не изучали. Именно поэтому основная задача нашей работы состояла в проведении скрининга мутаций таргетных онкогенов у больных лейкозом и в одновременной оценке экспрессии некоторых регуляторных генов, включая CASC5, WT1, A3A, N-MYC.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток, выделение белков, иммуноблотинг. Клетки Jurkat (Т-ОЛЛ) выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка при 37°С в атмосфере 5% СО2. Клетки собирали и отмывали от культуральной среды в 1 × PBS (150 мМ NaCl, 27 мМ KCl, 1.5 мМ KH₂PO₄ и 8.1 мМ Na₂HPO₄, pH 7.5). Экстракцию белков проводили на льду в лизирующем буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0.1 мМ EDTA, 50 мМ NaF, 1 мМ Na₂VO₅, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 0.5% NP-40, с добавлением 10 мкг/мл апротинина, леупептина и пепстатина, рН 7.5. Иммуноблотинг проводили с использованием антител к CASC5 ("ABclonal", США), N-МҮС ("Calbiochem", США), β-актину ("Santa Cruz Biotechnology", Канада).

Пациенты. В группу больных вошли 40 первичных онкогематологических больных (НМИЦ им. В.А. Алмазова), у которых диагностировали ОМЛ (n = 18), ХМЛ (n = 9), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ, n = 13). Средний возраст пациентов составил 37 лет. Со всеми пациентами и здоровыми донорами (n = 10) подписано добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Образцы костного мозга (КМ) отбирали в дебюте заболевания в пробирки с напылением EDTA, а в случае мониторинга — согласно проводимому лечению.

Иммунофенотипирование и селекция клеток CD34. Для определения поверхностных дифференцировочных антигенов (CD-маркеров) и содержания (%) бластных клеток в KM использовали проточную цитометрию (цитометр FacsCanto, "Becton Dickinson", CША) и коммерческие моноклональные антитела. Клетки-предшественники CD34 из KM больного ОМЛ выделяли согласно [10]. После сортировки клетки центрифугировали (4000 g, 10 мин), к осадку добавляли 0.1 мл 1 × PBS/20 мМ EDTA. Полученную суспензию клеток, содержащих ядро, выдерживали при 4°C в течение короткого времени до начала экстракции PHK.

Выделение РНК и синтез кДНК. РНК выделяли из 0.1 мл клеток линии Jurkat, 0.1 мл содержащих ядра клеток CD34, 1 мл клеток KM с использованием коммерческого набора реактивов: QIAamp RNA Blood Mini Kit ("Qiagen", Германия). Перед выделением РНК из клеток КМ проводили лизис эритроцитов с последующим центрифугированием. К суспензии клеток CD34 добавляли лизирующий раствор, дальнейшее выделение проводили согласно протоколу. РНК элюировали в 30 мкл буфера. Образцы РНК хранили при -70°С до момента постановки обратной транскрипции (ОТ). Реакцию ОТ проводили согласно методике для синтеза кДНК и набора реактивов RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit ("Fermentas", Литва).

Выделение ДНК. ДНК выделяли из 0.2 мл КМ с использованием коммерческого набора реактивов: QIAamp DNA Mini Kit ("Qiagen") согласно протоколу фирмы-производителя. ДНК элюировали в 50 мкл буфера. Образцы ДНК хранили при –20°С до проведения ПЦР.

Скрининг таргетных мутаций онкогенов. кДНК с целью выявления 15 разных онкогенных мутаций амплифицировали с помощью ПЦР на микрочипах в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [11]. Мутации в экзонах 14, 15, 20 гена *FLT3*, в экзоне 12 гена *NPM1* и в экзонах 4—9 гена *ABL* выявляли с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру с использованием секвенатора ABI PRISM 310 Genetic Analyzer ("Applied Biosystems", США), как описано ранее [12–14].

Количественный анализ генов. Для количественной оценки уровня мРНК регуляторных генов (*CASC5*, *N-MYC*, *A3A*, *WT1*, *SPT16*), таргет-

ных онкогенов (CBFβ-MYH11/A, AML1-ETO, NPM1/A, BCR-ABL/P210, BCR-ABL/P190, TEL-AML1), а также референсного гена GAPDH образец кДНК амплифицировали методом ПЦР-РВ согласно протоколу, опубликованному ранее [15, 16]. Для определения экспрессии генов WT1, CBFB-MYH11/A. AML1-ETO. NPM1/A. BCR-ABL/ P210, BCR-ABL/P190, TEL-AML1 выполняли ПЦР с использованием коммерческих наборов Fusion Quant Kit for RT-QPCR ("Qiagen") и Universal PCR Master Mix ("Applied Biosystems"). Экспрес-сию генов CASC5, N-MYC, A3A, SPT16 оценивали метолом ППР с использованием набора Universal PCR Master Mix ("Applied Biosystems") и коммерсинтезированных олигонуклеотидных чески праймеров, в том числе олигонуклеотидных зондов, несуших на 3'-конце флуоресцентный краситель FAM, подобранных через систему NCBI (нуклеотидные последовательности праймеров могут быть предоставлены по требованию). Результаты ПШР анализировали с помощью программного обеспечения к термоциклеру "Rotor-Gene 6000" ("Corbet Research", Австралия) после построения калибровочных кривых со стандартными разведениями плазмидных ДНК (10¹-10⁶). Пороговый уровень количественной экспрессии гена *WT1* в клетках KM здоровых доноров (n = 10) не превышал 250 копий/GAPDH. Превышение этого показателя рассматривали как повышение экспрессии [17]. Пороговые уровни экспрессии генов *CASC5*, *N-MYC*, *A3A*, *SPT16* определяли с использованием кДНК, синтезированной по PHK из клеточной линии Jurkat на второй день культивирования.

Цитогенетическое исследование. Культивирование клеток КМ больных лейкозом, приготовление препаратов хромосом и последующее дифференциальное окрашивание хромосом выполняли согласно [18]. Нарушения кариотипа оценивали по результатам анализа 20 митозов методом стандартного кариотипирования и/или 200 интерфазных ядер после проведения флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Статистический анализ. Корреляционную зависимость между уровнем экспрессии гена *CASC5* и таргетными онкогенными мутациями, выявленными у больных разных прогностических подгрупп, оценивали путем построения четырехпольных таблиц Фишера и с использованием критерия χ^2 [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первоначально провели скрининг таргетных мутаций онкогенов у больных лейкозом (*n* = 40).

Таргетная мутация, количество, больные с неблагоприятным прогнозом*	Таргетная мутация, количество, больные с благоприятным прогнозом**	Уровень относительной экспрессии регуляторного гена (<i>N/GAPDH</i>)	χ ² , <i>F</i> , <i>p</i>	
	Группа больных В-ОЛЛ	(n = 13)	·	
BCR-ABL/P190	TEL-AML1	CASC5		
6	1	$<4 \times 10^3/GAPDH$	6.198, 0.029,	
1	5	$>4 \times 10^3/GAPDH$	<i>p</i> < 0.05	
	Группа больных ХМЛ	(n = 9)		
BCR-ABL/P190, BCR-ABL/P210	<i>BCR-ABL/P210</i> (не выявлено мутаций в гене <i>ABL</i>)	CASC5		
4	0	$<5 \times 10^3/GAPDH$	5.760, 0.047,	
1	1 4		<i>p</i> < 0.05	
	Группа больных ОМЛ (n = 18)		
FLT3/ITD	NPM1/A, AML1-ETO, CBFβ-MYH11/A	CASC5		
5 1		$<4 \times 10^3/GAPDH$	10.125, 0.003,	
1	11	$>4 \times 10^3/GAPDH$	<i>p</i> <0.05	
Π	× ۲۲ ۲ ۲۵	0 221 ** 5 52 2(1		

Таблица 1. Таргетные мутации, характерные для относительно благоприятного и неблагоприятного прогноза при лейкозе (ХМЛ, ОМЛ, В-ОЛЛ), и относительная экспрессия гена *CASC5*

Примечание. *N* – количество копий анализируемого гена. * Из работ [20–22]; ** из работ [23–26].



Рис. 1. Экспрессия кинетохорного белка CASC5/KNL1 и онкобелка N-MYC в клеточной линии Jurkat (Т-ОЛЛ). Клетки Jurkat на 2, 4, 6-е сутки культивирования (2, 4, 6 соответственно). Иммуноблотинг клеточного экстракта с использованием антител к CASC5, N-MYC, β-актину.

В зависимости от прогностической значимости выявленных мутаций каждая группа пациентов с известной нозологией (ОМЛ, В-ОЛЛ, ХМЛ) была разделена на две подгруппы (относительно благоприятную и неблагоприятную) (табл. 1). Так, в группе ОМЛ (n = 18) подгруппу неблагоприятного прогноза составили пациенты (n = 6), у которых обнаружили мутацию в тандемном домене онкогена *FLT3/ITD*. Остальные пациенты (n = 12) относились к подгруппе относительно благоприятного прогноза — мутация FLT3/ITD у них отсутствовала, но обнаружена одна из трех других мутаций: NPM1/A (*n* = 4), *CBF* β -*MYH11/A* [inv16(p13;q21)] (n = 6), AML1-ETO [t(8;21)(q22;q22)] (n = 2). Средибольных В-ОЛЛ (n = 13) в подгруппу неблагоприятного прогноза (n = 7) вошли носители онкогенной мутации BCR-ABL/P190 [t(9;22)(q34;q11)], а подгруппу относительно благоприятного прогноза (n = 6) составили носители мутации *TEL-AML1* [t(12;21)(p13;q22)], большинство из которых были моложе 16 лет. Группа больных XMЛ (n = 9) состояла из шести человек с подтвержденной хронической фазой (ХФ) и трех пациентов (бласты 30, 57, 90%) с терминальной фазой заболевания или бластным кризом (БК). К подгруппе неблагоприятного прогноза (n = 5) отнесены три пациента с БК и двое больных с ХФ. У всех пациентов этой подгруппы обнаружены оба варианта химерного онкогена BCR-ABL [t(9;22)(q34;q11)]: BCR-*ABL/P210* и *BCR-ABL/P190*, а у одного из них (с подтвержденной ХФ) дополнительно выявлена точечная мутация T315I в тирозинкиназном домене (TKD) гена ABL. К относительно благоприятному прогнозу (n = 4) отнесены остальные больные ХМЛ (ХФ), у которых определен вариант онкогена BCR-ABL/P210. При этом вариант слитого онкогена BCR-ABL/P190, как и точечные мутации в гене *ABL*, не обнаружены.

В настоящей работе требовалось определить уровни экспрессии гена CASC5 и ближайшего круга регуляторных генов, включая WT1, A3A, N-МУС, в клетках КМ больных лейкозом и здоровых доноров, а также в контрольной клеточной линии Jurkat, в которой сверхэкспрессируются CASC5 и N-MYC (рис. 1). Результаты количественного анализа генной экспрессии представлены на рис. 2. Нами обнаружена общая тенденция к снижению уровней экспрессии генов CASC5, WT1, A3A, N-MYC в клетках KM у больных лейкозом. По уровню снижения экспрессии группы расположились в следующем порядке: ОМЛ, ХМЛ, В-ОЛЛ. При этом средние уровни экспрессии гена CASC5 у пациентов оказались значительно ниже, чем у здоровых доноров, а именно, в 4.9 (ОМЛ), 6.9 (ХМЛ) и 11.3 раза (В-ОЛЛ). Средние уровни экспрессии *N-МҮС* и АЗА при ОМЛ были выше, при В-ОЛЛ – ниже, при ХМЛ более высокой оказалась только экспрессия АЗА (N-MYC – более низкой) по сравнению со здоровыми донорами. При этом средние уровни экспрессии WT1 у всех пациентов были выше, чем у здоровых доноров: в 45.7 (ОМЛ), 22.0 (ХМЛ) и 9.4 раза (В-ОЛЛ).

Не обнаружив статистически значимых различий (p > 0.05) между уровнем экспрессии регуляторных генов, включая CASC5, и количеством бластных клеток (>70% vs ≤70%) у больных лейкозом, мы провели сравнительный анализ экспрессии этих генов в разных подгруппах с учетом нозологии и прогностической значимости таргетных мутаций. Показано, что понижение экспрессии гена *CASC5* коррелирует с выявлением у больных лейкозом таргетных мутаций онкогенов (табл. 1). Так, у шести из семи больных В-ОЛЛ (рис. 3*a*), носителей мутации *BCR-ABL/P190* (подгруппа неблагоприятного прогноза), уровни экспрессии *CASC5* были ниже ($<4 \times 10^3/GAPDH$), чем у пяти из шести носителей мутации TEL-AML1 (подгруппа относительно благоприятного прогноза), уровни экспрессии CASC5 у которых были, напротив, выше (>4 $\times 10^3$ /*GAPDH*). С помощью статистического анализа определены значимые различия между уровнем экспрессии гена *CASC5* и вариантами таргетных мутаций (p < 0.05, табл. 1) в обеих прогностических подгруппах В-ОЛЛ. Определение экспрессии других регуляторных генов в подгруппах больных В-ОЛЛ выявило сверхэкспрессию A3A (>2.3 × 10⁵/GAPDH) только у одного индивида (бласты 90%), носителя мутации TEL-AML1. При этом у этого же больного количество копий онкогена TEL-AML1 оказалось выше, чем у других пациентов этой подгруппы. И, наконец, еще у одного больного В-ОЛЛ (бласты 67%), носителя мутации BCR-ABL/P190, обнаружена сверхэкспрессия WT1 (>2 × $10^3/GAPDH$). При этом количество копий онкогена BCR-ABL/P190 у этого больного оказалось больше, чем у других членов подгруппы.

В группе больных ХМЛ (рис. 36) оба варианта BCR-ABL: BCR-ABL/P210 и BCR-ABL/P190 (подгруппа неблагоприятного прогноза) обнаружены у пяти пациентов (БК, n = 3; Х Φ , n = 2), и у четырех из них уровни экспрессии CASC5 оказались ниже ($<5 \times 10^3/GAPDH$), чем у остальных четырех пациентов (ХФ), несущих только один вариант онкогена BCR-ABL/P210 (подгруппа относительно благоприятного прогноза). В последней подгруппе больных, у которых обнаружили мутацию BCR-ABL/P210 и не выявили точечные мутации гена ABL, уровни экспрессии CASC5 оказались, напротив, выше (>5 × 10³/*GAPDH*). Различия между уровнем экспрессии гена CASC5 и вариантами таргетных мутаций в обеих прогностических погруппах были статистически значимыми (р < 0.05, табл. 1). В то же время определение экспрессии других регуляторных генов у больных ХМЛ показало, что только у одного из них (ХФ, бласты 3.8%) одновременное присутствие слитых онкогенов BCR-ABL/P210 и BCR-ABL/P190 сопровождалось сверхэкспрессией A3A (>2.6 × 10⁵/GAPDH) и превышением порогового уровня экспрессии WT1. Сверхэкспрессия WT1 (>2 \times 10³/GAPDH) обнаружена у двух пациентов с ХМЛ (БК, бласты 30, 57%), у которых выявили оба варианта онкогена BCR-ABL: BCR-ABL/P210 и BCR-ABL/P190.

В группе больных ОМЛ, состоящей из 18 человек (рис. 3в), у пяти из шести носителей мутации FLT3/ITD (подгруппа неблагоприятного прогноза) уровни экспрессии CASC5 были ниже (<4 × $\times 10^3$ /GAPDH), чем у остальных 11 из 12 носителей одной из трех других мутаций: NPM1/A, $AML1-ETO, CBF\beta-MYH11/A$ (подгруппа относительно благоприятного прогноза), у которых уровни экспрессии *CASC5* были, напротив, выше $(>4 \times 10^{3}/GAPDH)$. Различия между уровнем экспрессии гена CASC5 и вариантами таргетных мутаций в обеих прогностических подгруппах больных ОМЛ были статистически значимыми (p < 0.05, табл. 1). Интересно, что в подгруппах больных ОМЛ сверхэкспрессия регуляторных генов WT1, АЗА и N-MYC выявлена только у двух пациентов (бласты 47, 38%), один из которых носитель мутации FLT3/ITD, а другой — мутации *СВF*В-*М*YH11/А. Первоначально сверхэкспрессию *N-MYC* обнаружили у взрослых больных ОМЛ, у детей, получающих лечение при Т-ОЛЛ и нейробластоме, что коррелировало с плохим прогнозом [27-29]. Кроме того, оказалось, что сверхэкспрессия онкогена *N-MYC* при нейробластоме поддерживалась при участии фактора транскрипции SPT16 [30]. Тем не менее, экспрессию гена SPT16 при ОМЛ не определяли, в том числе и у пациентов с повышенной экспрессией *N-MYC*.



Рис. 2. Профили относительной экспрессии регуляторных генов в клеточной линии Jurkat (Т-ОЛЛ) у здоровых доноров (n = 10) и у больных лейкозом (n = 40). N -Количество копий анализируемого гена. - CASC5, -A3A, -N-MYC, -WT1.

Дополнительно мы провели количественный анализ уровней экспрессии гена SPT16 в группе больных ОМЛ (n = 18). В качестве контроля использовали клеточную линию Jurkat (Т-ОЛЛ) со сверхэкспрессией *SPT16* (2.9 \times 10⁴/*GAPDH*). Только у двух больных ОМЛ (бласты 47, 38%) со сверхэкспрессией *N-МҮС* повышенным оказался также уровень экспрессии гена SPT16 (>3.4 × $\times 10^4$ /*GAPDH*). В дальнейшем этим двум пациентам, получающим лечение, потребовалось провести мониторинг экспрессии регуляторных и таргетных генов. Следует отметить, что у одного из них (бласты 47%), носителя таргетной мутации FLT3/ITD, после проведения курса ПХТ выполнили гаплоидентичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Однако мониторинг биомаркеров у этого пациента не был проведен (вскоре после достижения полной клинико-гематологической ремиссии у больного развился рецидив, который привел к летальному исходу). Одновременный анализ таргетных и регуляторных генов проведен у другого больного ОМЛ (бласты 38%), носителя мутации СВГВ-МҮН11/А, который получал только ПХТ (трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток ему не рекомендовали по кардиологическим показателям) (рис. 4). С помощью количественной ПЦР в КМ обнаружено повышенное количество копий слитого онкогена *CBF*β-*MYH11*/A. В то же время проведенный цитогенетический анализ, включая FISH, подтвердил наличие инверсии хромосомы 16 [inv(16)(p13;q22)] в 88% клеток КМ, приводящей к слиянию генов *CBF*^β и *MYH11*. Иммунофено-



Рис. 3. Профили относительной экспрессии регуляторных генов, количество бластных клеток (%) и вариант онкогенной мутации у больных лейкозом. $a - \Gamma$ руппа В-ОЛЛ; $\delta -$ группа ХМЛ; e - группа ОМЛ. N - количество копий анализируемого гена; на оси слева: – – CASC5, – WTI. на оси справа: – A3A, – A-N-MYC.

типирование поверхностных CD-маркеров позволило обнаружить в KM пациента популяцию бластных клеток с аберрантным фенотипом (Cd45dimCD34+CD38+CD117+CD13+CD33+), что характерно для ОМЛ. Дополнительный анализ уровней экспрессии генов *N-MYC*, *SPT16*, *A3A*, *CASC5* в KM выявил увеличение экспрессии первых трех генов в 5.2, 3.2, 26.3 раза, соответственно, и, напротив, снижение экспрессии *CASC5* в 1.7 раза по сравнению с контролем. В дальнейшем (спустя 1 мес после начала ПХТ (GO + HiDAC)) у пациента появилась резистентность к лечению, и популяция бластных клеток в КМ увеличилась до 50%. При этом не обнаружены мутации в гене *DNMT3A*, кодирующем ДНК-метилтрансферазу, дисфункция которой часто связана с гипометилированием генома и устойчивостью к терапии (HiDAC). В то же время у боль-


Рис. 3. Окончание.

ного выявили повышение экспрессии генов WT1, N-MYC, SPT16, A3A, CASC5 в клетках CD34, выделенных с использованием проточной цитометрии – в 17.0, 10.6, 4.7, 1.2, 10.4 раза, соответственно, по сравнению с тотальным КМ. Таким образом, превышение уровней экспрессии упомянутых генов, включая SPT16, в клетках-предшественниках CD34 указывает на преобладание в KM популяции резистентных к лечению клеточных элементов с активной пролиферацией. В дальнейшем смена терапии (малые дозы Ara-с и азацитидина) привела к снижению количества бластных клеток (0.6%) и уровней экспрессии этих генов, что согласуется с наступлением ремиссии. Однако через 4 мес у больного развился рецидив (бласты: 62%). При этом уровень экспрессии генов *N-MYC*, SPT16, A3A повысился в 1.2, 1.8, 3.3 раза, соответственно, а CASC5 понизился по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании у всех первичных больных лейкозом (В-ОЛЛ, ОМЛ, ХМЛ) определены таргетные онкогенные мутации, а также оценена экспрессия регуляторных генов, включая *CASC5*, *WT1*, *A3A*, *N-MYC*, влияющих на область центромеры (перицентромеры) (табл. 2). Так, у больных В-ОЛЛ выявлены мутации онкогенов *BCR-ABL/P190*, *TEL-AML*, у больных ХМЛ разные варианты онкогена *BCR-ABL* (*BCR-ABL/ P210*, *BCR-ABL/P190*), тогда как больные ОМЛ были носителями мутаций *NPM1/A*, *AML1-ETO*,

СВҒВ-МҮН11/А, FLT3/ITD. Согласно опубликованным данным, мутации, обнаруженные у больных лейкозом, имеют разную прогностическую значимость (табл. 1). Так, больные В-ОЛЛ, у которых обнаружили мутации онкогена ВСЯ-ABL/P190, больные XMЛ с обоими вариантами онкогена BCR-ABL (BCR-ABL/P190 и BCR-ABL/P210) и больные ОМЛ с мутациями гена FLT3/ITD были отнесены к подгруппе неблагоприятного прогноза. Остальные пациенты, включая больных В-ОЛЛ (носители мутации TEL-AML1), XMЛ (носители онкогена BCR-ABL/P210, при отсутствии мутаций в гене ABL), ОМЛ (носители одной из трех мутаций генов NPM1/A, АМL1-ЕТО, СВГβ-МҮН11/А), составили подгруппу относительно благоприятного прогноза.

Дальнейший анализ экспрессии регуляторных генов, включая CASC5, WT1, A3A, N-MYC, у первичных больных лейкозом позволил обнаружить общую тенденцию к снижению экспрессии этих генов. По уровню снижения экспрессии группы больных расположились в следующем порядке: ОМЛ, ХМЛ, В-ОЛЛ. При этом в клеточной линии Jurkat (Т-ОЛЛ) экспрессия генов CASC5 и N-МҮС оказалась выше, чем в исследуемых группах больных. Такое различие в уровнях экспрессии регуляторных генов у пациентов и в клеточной линии Jurkat может объясняться несколькими причинами: разной нозологией, соседством лейкозных клеток в КМ с клетками стромального микроокружения, которые регулируют их пролиферацию и дифференцировку, а также с опреде-



Рис. 4. Мониторинг биомаркеров у больного ОМЛ, получающего полихимиотерапию. Примечания: N – количество копий анализируемого гена; на оси слева: - - A3A, - - N-MYC, на оси справа: - - CASC5, - - WT1, - - SPT16.

лением экспрессии генов в клетках линии Jurkat на второй день культивирования. Следует отметить, что у всех пациентов экспрессия гена *CASC5* была значительно ниже, чем у здоровых доноров. Кроме того, оказалось, что чрезмерное снижение экспрессии гена *CASC5* коррелирует с выявлением таргетных мутаций, характерных для неблагоприятного прогноза при лейкозе. Угнетение экспрессии гена *CASC5* может приводить к нарушению взаимодействия кодируемого им белка CASC5 с другими белками прицентромерной области, включая кинетохорный комплекс KMN (<u>KNL1/CASC5, MIS12, NDC80</u>), обеспечивающий присоединение микротрубочек веретена деления к соответствующим центромерам до наступления анафазы митоза. Одной из причин изменения экспрессии *CASC5* при лейкозе может быть влияние таргетных онкогенных мутаций.

Ген, хромосома	Кодируемый белок и его функция*				
<i>CASC5</i> , 15q15.1	5.1 Кинетохорный белок CASC5/KNL1, локализуется в центромере, взаимодействует с BUBR1, с которым ассоциирован MAD2 (белок контрольной точки сборки веретена деления)				
<i>WT1</i> , 11p13	Белок опухоли Вильмса, онкоген <i>WT1</i> , взаимодействует с MAD2, способствует стабилизации тетрамеров MAD1–MAD2, повышает точность работы контрольной точки сборки веретена деления				
<i>APOBEC3A(A3A</i>), 22q13.1	Дезаминаза АЗА, высоко экспрессируется в прицентромерном районе хромосомы (α-сателлитная ДНК), участвует в С/U- редактировании нуклеотидов ДНК; способствует супрессии транспозонов LINE1, локализованных по соседству с α-сателлитной ДНК и микротрубочками веретена деления				
<i>N-MYC</i> , 2p24.3	Онкоген <i>N-MYC</i> , высоко экспрессируется в нейробластомах, ассоциирован с AURKA/AURKB, локализуемыми в центросомах/центромерах, что способствует стабилизации и накоплению N-MYC				

Таблица 2. Влияние регуляторных генов, включая *CASC5*, *WT1*, *A3A*, *N-MYC*, на область центромеры (перицентромеры)

* Из работ [31-37].

К настоящему времени известно несколько случаев, когда онкогенные мутации оказывают влияние на экспрессию некоторых компонентов кинетохора при лейкозе. Так, при ОМЛ снижается экспрессия BUBR1, белка контрольной точки сборки веретена деления, который вступает в ассоциацию с CASC5 [38]. Полагают, что снижение экспрессии BUBR1 контролируется онкогеном AML1-ETO. Это способствует ослаблению контрольной точки сборки веретена деления и может приводить к развитию анеуплоидии. Однако при В-ОЛЛ слитый онкоген TEL-AML1 участвует в регуляции экспрессии гена *MAD2*, кодирующего белок контрольной точки сборки веретена деления, который взаимодействует с BUBR1 [39]. Кроме того, недавно обнаружили, что слитый онкоген BCR-ABL может снижать экспрессию MAD2, в частности, в клеточной линии мышей (32D), экспрессирующей экзогенный ген *Bcr-Abl*. В свою очередь, это коррелирует с нарушением функции митотического веретена деления и развитием анеуплоидии [40]. В двух последних случаях изменение экспрессии MAD2, по-видимому, способствует несбалансированной экспрессии белков кинетохорного комплекса, не исключая CASC5, что стимулирует ослабление их функции и, в конечном итоге, повышает пролиферацию лейкозных клеток. В норме MAD2 контролирует сцепление между сестринскими хроматидами в анафазе митоза, а в случае неправильного присоединения микротрубочек к центромерам блокирует расхождение хромосом и препятствует развитию анеуплоидии. Интересно отметить, что только недавно стало известно, что онкобелок WT1 опухоли Вильмса взаимодействует с белком MAD2 при митозе [33]. Это способствует стабилизации тетрамеров MAD1-MAD2 и повышает точность работы контрольной точки сборки веретена деления (табл. 2).

Повышенная экспрессия гена WT1 (≥1 × × 10³/GAPDH) обнаружена нами в одном случае В-ОЛЛ, у двух больных ХМЛ и 13 больных ОМЛ (рис. 3a-e). Сверхэкспрессия WT1 (>2.6 × 10^{3} / GAPDH) выявлена только у двух больных XMЛ (бласты 30, 57%) с подтвержденной стадией БК, у одного из которых отмечена повышенная экспрессия гена АЗА, кодирующего дезаминазу АЗА. Ранее при ХМЛ (БК) наблюдали повышенную экспрессию еще одной дезаминазы, ADAR1, отвечающей за редактирование А/І в РНК, что ассоциировано с плохим прогнозом и устойчивостью к терапии [41, 42]. Следует отметить, что ADAR1 контролирует экспрессию CASC5 в клетках глиобластомы (А172), а также ближайшего гомолога АЗА, дезаминазы АЗС, в клетках цервикального рака (HeLa) [43, 44]. Известно, что экспрессия дезаминазы АЗА ассоциирована с активным дезаминированием, повышением редактирования G/A гена WT1^{с.1303G>A} и может быть

одной из причин мутационных изменений онкогена WT1 и его сверхэкспрессии [45]. Скрининг мутаций онкогена WT1 в настоящей работе не проводили, однако анализ средних уровней экспрессии WT1 показал, что в группе больных ОМЛ экспрессия WT1 была выше, чем в группах XMЛ и B-OЛЛ (рис. 2). Известно, что повышенный уровень экспрессии онкогена WT1 в дебюте ОМЛ является важным прогностическим показателем. Количественный мониторинг экспрессии этого онкогена позволяет оценить минимальную остаточную болезнь у больных ОМЛ, получающих лечение, и предсказать риск развития рецидива [17].

И, наконец, только в двух случаях ОМЛ нами выявлена сверхэкспрессия онкогена *N-MYC*, что коррелирует с повышением экспрессии WT1, A3A и понижением экспрессии CASC5 (рис. 3в). Ранее было показано, что повышение экспрессии онкогена *N-MYC*, обнаруженное у взрослых пациентов с ОМЛ и у детей с Т-ОЛЛ, коррелирует с плохим прогнозом [27, 28]. Известно, что онкоген *N-MYC* способствует самообновлению стволовых клеток в КМ и является одним из ключевых генов, трансфекция которого здоровым мышам приводит к развитию у них ОМЛ [27]. Сверхэкспрессию *N-MYC* обнаружили недавно у детей с нейробластомой [29]. Позже показали, что в клетках нейробластомы сверхэкспрессия онкогена N-МҮС поддерживается при участии фактора транскрипции SPT16 [30]. Как SPT16, так и SSRP1 входят в состав белкового комплекса FACT (facilitates chromatin transcription) и участвуют в ремоделировании хроматина [46, 47]. К настоящему времени известно, что для выживания и поддержания потенциала самообновления клеток ОМЛ (клеточные линии мышей, несущие мутацию *Mll-Af9* или *Cbf* β -*Myh11*) требуется, в частности, фактор транскрипции BRG1 (SMARCA4), который связывается с хроматином и входит в состав комплекса SWI/SNF [48, 49]. Белок BRG1. vчаствующий в ремоделировании нуклеосомной ДНК, поддерживает повышенную транскрипцию онкогена с-Мус и способствует сохранению пула лейкозных клеток. Повышение экспрессии с-МҮС в нашей работе не обнаружено. При этом у двух упомянутых первичных пациентов (ОМЛ) выявлена сверхэкспрессия гена *N-MYC* и повышение экспрессии SPT16. У одного из этих больных (бласты 38%), носителя мутации СВГВ-МҮН11/А, получающего ПХТ, проведен мониторинг экспрессии всех биомаркеров. Повышение экспрессии онкогена *N-MYC* коррелировало с увеличением экспрессии генов SPT16, WT1, A3A и снижением экспрессии CASC5, что согласуется с устойчивостью к лечению и прогрессией ОМЛ (рис. 4).

Недавно стало известно, что повышению экспрессии N-MYC может способствовать не только SPT16, но и белок AURKA/В. По крайней мере, сверхэкспрессия AURKA при нейробластоме ингибирует протеолиз N-MYC, что приводит к стабилизации этого белка и его накоплению [36]. Повышенная экспрессия гена AURKA/В и кодируемого им белка выявлена при ОМЛ [50]. Если предположить, что AURKA/В вовлекается во взаимодействие с фракцией N-MYC, связанной с микротрубочками веретена деления, то участие обоих белков в регуляции биполярного присоединения микротрубочек до наступления анафазы митоза можно рассматривать как наиболее вероятное событие. И, наконец, благодаря обнаружению ассоциации белков AURKA/В с NDC80 и CASC5 компонентами комплекса КМN (KNL1/CASC5. MIS12, NDC80), вступающими в контакт с CENPT и CENPA (CenH3), с которыми взаимодействует SPT16. можно предположить возможность взаимодействия AURKA/B, MYCN и SPT16. Однако проверка этой гипотезы требует проведения дополнительных экспериментов.

Таким образом, у всех первичных больных лейкозом (n = 40) обнаружено снижение экспрессии гена *CASC5* в клетках КМ – в 4.9 (ОМЛ), 6.9 (ХМЛ) и 11.3 раза (В-ОЛЛ) по сравнению со здоровыми донорами. Показано также, что снижение экспрессии гена CASC5 при ОМЛ, ХМЛ и В-ОЛЛ коррелирует с выявлением таргетных мутаций в обеих прогностических подгруппах (относительно благоприятная и неблагоприятная), которые статистически значимо различаются между собой (p < 0.05). И, наконец, изменение экспрессии гена CASC5 ассоциировано со сверхэкспрессией генов WT1, A3A, а в некоторых случаях и N-MYC, SPT16, что сопровождается устойчивостью к терапии и прогрессией ОМЛ. Какой из генов является драйверным, инициирующим процесс лейкемогенеза, и в чем заключается роль фактора транскрипции SPT16, сверхэкспрессируемого одновременно с онкогеном N-MYC при лейкозе? Ответ на этот вопрос позволит лучше понять механизмы лейкемогенеза.

Написание настоящей статьи не потребовало специального финансирования.

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Всеми пациентами и здоровыми донорами подписано добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Hayette S., Tigaud I., Vanier A., Martel S., Corbo L., Charrin C., Beillard E., Deleage G., Magaud J.P., Rimokh R. (2000) AF15q14, a novel partner gene fused to the MLL gene in an acute myeloid leukaemia with a t(11;15)(q23;q14). Oncogene. **19**, 4446–4450.

- Kuefer M.U., Chinwalla V., Zeleznik-Le N.J., Behm F.G., Naeve C.W., Rakestraw K.M., Mukatira S.T., Raimondi S.C., Morris S.W. (2003) Characterization of the *MLL* partner gene *AF15q14* involved in t(11;15)(q23;q14). *Oncogene*. 22, 1418–1424.
- 3. Chinwalla V., Chien A., Odero M., Neilly M.B., Zeleznik-Le N.J., Rowley J.D. (2003) A t(11;15) fuses *MLL* to two different genes, *AF15q14* and a novel gene *MPFYVE* on chromosome 15. *Oncogene*. **22**, 1400– 1410.
- 4. Yang J.J., Park T.S., Lee S.T., Seo J.Y., Oh S.H., Cho E.H., Strehl S., Mühlegger N., Dworzak M.N., Zuna J., Pospisilova D., Meyer C., Marschalek R., Kim H.J., Kim S.H. (2014) Molecular characterization and clinical impact of t(11;15)(q23;q14-15) *MLL-CASC5* rearrangement. *Haematologica*. 99, e11–3. https://doi.org/10.3324/haematol.2013.095638
- Genin A., Desir J., Lambert N., Biervliet M., Van Der Aa N., Pierquin G., Killian A., Tosi M., Urbina M., Lefort A., Libert F., Pirson I., Abramowicz M. (2012) Kinetochore KMN network gene *CASC5* mutated in primary microcephaly. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 5306– 5317.

https://doi.org/10.1093/hmg/dds386

- Sloma I., Mitjavila-Garcia M.T., Feraud O., Griscelli F., Oudrhiri N., Marsafy S., Gobbo E., Divers D., Proust A., Smadja D.M., Desterke C., Carles A., Ma Y., Hirst M., Marra M.A., Eaves C.J., Bennaceur-Griscelli A., Turhan A.G. (2017) Whole-genome analysis reveals unexpected dynamics of mutant subclone development in a patient with JAK2-V617F-positive chronic myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* 53, 48–58. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2017.05.007
- Богданов К.В., Такимото М. (2008) Регуляция клеточной пролиферации в норме и при опухолевом росте. *Цитология*. 50, 590–596.
- Takimoto M., Wei G., Dosaka-Akita H., Mao P., Kondo S., Sakuragi N., Chiba I., Miura T., Itoh N., Sasao T., Koya R.C., Tsukamoto T., Fujimoto S., Katoh H., Kuzumaki N. (2002) Frequent expression of new cancer/testis gene *D40/AF15q14* in lung cancers of smokers. *Br. J. Cancer.* 86, 1757–1762.
- Bai T., Zhao Y., Liu Y., Cai B., Dong N., Li B. (2019) Effect of KNL1 on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells. *Technol. Cancer Res. Treat.* 18, 1533033819858668. https://doi.org/10.1177/1533033819858668
- Bornhäuser M., Oelschlaegel U., Platzbecker U., Bug G., Lutterbeck K., Kiehl M.G., Schetelig J., Kiani A., Illmer T., Schaich M., Theuser C., Mohr B., Brendel C., Fauser A.A., Klein S., Martin H., Ehninger G., Thiede C. (2009) Monitoring of donor chimerism in sorted CD34⁺ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 94, 1613–1617. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.007765
- Богданов К.В., Никулина Т.С., Ломаиа Е.Г., Сляднев М.Н., Зарицкий А.Ю. (2017) Выявление мутаций онкогенов у больных лейкозом с использова-

нием микрочиповой ПЦР. Биоорган. химия. 43, 523-531.

- Murphy K.M., Levis M., Hafez M.J., Geiger T., Cooper L.C., Smith B.D., Small D., Berg K.D. (2003) Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *J. Mol. Diagn.* 5, 96–102.
- Döhner K., Schlenk R.F., Habdank M., Scholl C., Rücker F.G., Corbacioglu A., Bullinger L., Fröhling S., Döhner H. (2005) Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood.* 106, 3740– 3746.
- Bennour A., Beaufils N., Sennana H., Meddeb B., Saad A., Gabert J. (2010) E355G mutation appearing in a patient with e19a2 chronic myeloid leukaemia resistant to imatinib. *J. Clin. Pathol.* 8, 737–740.
- 15. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N., Barbany G., Cazzaniga G., Cayuela J.M., Cavé H., Pane F., Aerts J.L., De Micheli D., Thirion X., Pradel V., González M., Viehmann S., Malec M., Saglio G., van Dongen J.J. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 17, 2318–2357.
- 16. Beillard E., Pallisgaard N., van der Velden V.H., Bi W., Dee R., van der Schoot E., Delabesse E., Macintyre E., Gottardi E., Saglio G., Watzinger F., Lion T., van Dongen J.J., Hokland P., Gabert J. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe against cancer program. *Leukemia.* 17, 2474–2486.
- Cilloni D., Renneville A., Hermitte F., Hills R.K., Daly S., Jovanovic J.V., Gottardi E., Fava M., Schnittger S., Weiss T., Izzo B., Nomdedeu J., van der Heijden A., van der Reijden B.A., Jansen J.H., van der Velden V.H., Ommen H., Preudhomme C., Saglio G., Grimwade D. (2009) Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European Leukemia Net study. *J. Clin. Oncol.* 27, 5195–5201. https://doi.org/10.1200/ICC0.2000.22.4865

https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4865

- Verma R., Babu A. (1989) in: *Human chromosomes:* manual of basic techniques. N.Y.: Pergamon Press, 45–67.
- Гублер Е.В., Генкин А.А. (1969) Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина.
- 20. Gleissner B., Gökbuget N., Bartram C.R., Janssen B., Rieder H., Johannes W.G., Janssen J.W.G., Fonatsch C., Heyll A, Voliotis D., Beck J., Lipp T., Munzert G., Maurer J., Hoelzer D. (2002) Leading prognostic relevance of the *BCR-ABL* translocation in adult acute Blineage lymphoblastic leukemia: a prospective study of

the German Multicenter Trial Group and confirmed polymerase chain reaction analysis. *Blood.* **99**, 1536–1543.

https://doi.org/10.1182/blood.v99.5.1536

- Molica M., Zacheo I., Diverio D., Alimena G., Breccia M. (2015) Long-term outcome of chronic myeloid leukaemia patients with p210 and p190 co-expression at baseline. *Br. J. Haematol.* 169, 148–150. https://doi.org/10.1111/bjh.13184
- Sallmyr A., Fan J., Datta K., Kim K., Grosu D., Shapiro P., Smal D., Rassool F. (2007) Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood.* 111, 3173–3182.

https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-092510

- McLean T.W., Ringold S., Neuberg D., Stegmaier K., Tantravahi R., Ritz J., Koeffler H.P., Takeuchi S., Janssen J. W., Seriu T., Bartram C.R., Sallan S.E., Gilliland D.G., Golub T.R. (1996) TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 88, 4252– 4258.
- 24. Verma D., Kantarjian H.M., Jones D., Luthra R., Borthakur G., Verstovsek S., Rios M.B., Cortes J. (2009) Chronic myeloid leukemia (CML) with P190 BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood.* **114**, 2232–2235. https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-204693
- 25. Grimwade D., Walker H., Oliver F., Wheatley K., Harrison C., Harrison G., Rees J., Hann I., Stevens R., Burnett A., Goldstone A. (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1.612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood.* 92, 2322–2333.
- 26. Becker H., Marcucci G., Maharry K., Margeson D., Whitman S.P., Wu Y., Schwind S., Paschka P., Powell B.L., Carter T.H., Kolitz J.E., Wetzler M., Carroll A.J., Baer M.R., Caligiuri M.A., Larson R.A., Bloomfield C.D. (2010) Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. J. Clin. Oncol. 28, 596–604. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.1496
- Kawagoe H., Kandilci A., Kranenburg T.A., Grosveld G.C. (2007) Overexpression of N-Myc rapidly causes acute myeloid leukemia in mice. *Cancer Res.* 67, 10677–10685.
- Astolfi A., Vendemini F., Urbini M., Melchionda F., Masetti R., Franzoni M., Libri V., Serravalle S., Togni M., Paone G., Montemurro L., Bressanin D., Chiarini F., Martelli A.M., Tonelli R., Pession A. (2014) MYCN is a novel oncogenic target in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 5, 120–130.
- Alaminos M., Mora J., Cheung N.K., Smith A., Qin J., Chen L., Gerald W.L. (2003) Genome-wide analysis of gene expression associated with MYCN in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 63, 4538–4546.

 Carter D.R., Murray J., Cheung B.B., Gamble L., Koach J., Tsang J., Sutton S., Kalla H., Syed S., Gifford A.J., Issaeva N., Biktasova A., Atmadibrata B., Sun Y., Sokolowski N., Ling D., Kim P.Y., Webber H., Clark A., Ruhle M., Liu B., Oberthuer A., Fischer M., Byrne J., Saletta F., Thwe le M., Purmal A., Haderski G., Burkhart C., Speleman F., De Preter K., Beckers A., Ziegler D.S., Liu T., Gurova K.V., Gudkov A.V., Norris M.D., Haber M., Marshall G.M. (2015) Therapeutic targeting of the MYC signal by inhibition of histone chaperone FACT in neuroblastoma. *Sci. Transl. Med.* 7, 312ra176.

https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab1803

- Kiyomitsu T., Obuse C., Yanagida M. (2007) Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev. Cell.* 13, 663–676. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.09.005
- Tipton A.R., Wang K., Link L., Bellizzi J.J., Huang H., Yen T., Liu S. (2011) BUBR1 and closed MAD2 (C-MAD2) interact directly to assemble a functional mitotic checkpoint complex. J. Biol. Chem. 286, 21173–21179. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.238543
- Shandilya J., Toska E., Richard D.J., Medler K.F., Roberts S.G. (2014) WT1 interacts with MAD2 and regulates mitotic checkpoint function. *Nat. Commun.* 5, 4903.

https://doi.org/10.1038/ncomms5903

- 34. Shu X., Liu M., Lu Z., Zhu C., Meng H., Huang S., Zhang X., Yi C. (2018) Genome-wide mapping reveals that deoxyuridine is enriched in the human centromeric DNA. *Nat. Chem. Biol.* 14, 680–687. https://doi.org/10.1038/s41589-018-0065-9
- Richardson S.R., Narvaiza I., Planegger R.A., Weitzman M.D., Moran J.V. (2014) APOBEC3A deaminates transiently exposed single-strand DNA during LINE-1 retrotransposition. *Elife*. 3, e02008. https://doi.org/10.7554/eLife.02008
- Otto T., Horn S., Brockmann M., Eilers U., Schüttrumpf L., Popov N., Kenney A.M., Schulte J.H., Beijersbergen R., Christiansen H., Berwanger B., Eilers M. (2009) Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell.* 15, 67–78.

https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.005

- 37. Bogen D., Wei J.S., Azorsa D.O., Ormanoglu P., Buehler E., Guha R., Keller J.M., Griner L.A.M., Ferrer M., Song Y.K., Liao H., Mendoza A., Gryder B.E., Sindri S., He J., Wen X., Zhang S., Shern J.F., Yohe M.E., Taschner-Mandl S., Shohet J.M., Thomas C.J., Martin S.E., Ambros P.F., Khan J. (2015) Aurora B kinase is a potent and selective target in MYCN-driven neuroblastoma. *Oncotarget.* 6, 35247–35262. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6208
- Schnerch D., Schmidts A., Follo M., Udi J., Felthaus J., Pfeifer D., Engelhardt M., Wäsch R. (2013) BubR1 is frequently repressed in acute myeloid leukemia and its re-expression sensitizes cells to antimitotic therapy. *Haematologica*. 98, 1886–1895. https://doi.org/10.3324/haematol.2013.087452

- 39. Krapf G., Kaindl U., Kilbey A., Fuka G., Inthal A., Joas R., Mann G., Neil J.C., Haas O.A., Panzer-Grümayer E.R. (2010) ETV6/RUNX1 abrogates mitotic checkpoint function and targets its key player MAD2L1. Oncogene. 29, 3307–3312. https://doi.org/10.1038/onc.2010.53
- 40. Wolanin K., Magalska A., Kusio-Kobialka M., Podszywalow-Bartnicka P., Vejda S., McKenna S.L., Mosieniak G., Sikora E., Piwocka K. (2010) Expression of oncogenic kinase Bcr-Abl impairs mitotic checkpoint and promotes aberrant divisions and resistance to microtubule-targeting agents. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1328–1338. https://doi.org/10.1158/1525.71(2.MCT.00.002())

https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0936

Zipeto M.A., Court A.C., Sadarangani A., Delos Santos N.P., Balaian L., Chun H.J., Pineda G., Morris S.R., Mason C.N., Geron I., Barrett C., Goff D.J., Wall R., Pellecchia M., Minden M., Frazer K.A., Marra M.A., Crews L.A., Jiang Q., Jamieson C.H.M. (2016) ADAR1 activation drives leukemia stem cell self-renewal by impairing Let-7 biogenesis. *Cell Stem Cell.* 19, 177–191.

https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.004

- Jiang Q., Crews L.A., Barrett C.L., Chun H.J., Court A.C., Isquith J.M., Zipeto M.A., Goff D.J., Minden M., Sadarangani A., Rusert J.M., Dao K.H., Morris S.R., Goldstein L.S., Marra M.A., Frazer K.A., Jamieson C.H. (2013) ADAR1 promotes malignant progenitor reprogramming in chronic myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 1041–1046. https://doi.org/10.1073/pnas.1213021110
- Galipon J., Ishii R., Suzuki Y., Tomita M., Ui-Tei K. (2017) Differential binding of three major human ADAR isoforms to coding and long non-coding transcripts. *Genes* (Basel). 8, pii: E68. https://doi.org/10.3390/genes8020068
- Sakurai M., Shiromoto Y., Ota H., Song C., Kossenkov A.V., Wickramasinghe J., Showe L.C., Skordalakes E., Tang H.Y., Speicher D.W., Nishikura K. (2017) ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 534–543. https://doi.org/10.1038/nsmb.3403
- Niavarani A., Currie E., Reyal Y., Anjos-Afonso F., Horswell S., Griessinger E., Luis Sardina J., Bonnet D. (2015) APOBEC3A is implicated in a novel class of Gto-A mRNA editing in WT1 transcripts. *PLoS One.* 10, e0120089.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120089

- 46. Orphanides G., Wu W.H., Lane W.S., Hampsey M., Reinberg D. (1999) The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature.* **400**, 284–288.
- 47. Belotserkovskaya R., Oh S., Bondarenko V.A., Orphanides G., Studitsky V.M., Reinberg D. (2003) FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science*. **301**, 1090–1093.
- Shi J., Whyte W.A., Zepeda-Mendoza C.J., Milazzo J.P., Shen C., Roe J.S., Minder J.L., Mercan F., Wang E., Eckersley-Maslin M.A., Campbell A.E., Kawaoka S., Shareef S., Zhu Z., Kendall J., Muhar M., Haslinger C.,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

150

Yu M., Roeder R.G., Wigler M.H., Blobel G.A., Zuber J., Spector D.L., Young R.A., Vakoc C.R. (2013) Role of SWI/SNF in acute leukemia maintenance and enhancer-mediated Myc regulation. *Genes Dev.* **27**, 2648–2662.

https://doi.org/10.1101/gad.232710.113

 Pulikkan J.A., Hegde M., Ahmad H.M., Belaghzal H., Illendula A., Yu J., O'Hagan K., Ou J., Muller-Tidow C., Wolfe S.A., Zhu L.J., Dekker J., Bushweller J.H., Castilla L.H. (2018) CBFβ-SMMHC inhibition triggers apoptosis by disrupting MYC chromatin dynamics in acute myeloid leukemia. *Cell.* **174**, 172–186.e21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.048

50. Lucena-Araujo A.R., de Oliveira F.M., Leite-Cueva S.D., dos Santos G.A., Falcao R.P., Rego E.M. (2011) High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 35, 260–264. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.07.034

IN LEUKEMIA IMPAIRMENT OF *CASC5* GENE EXPRESSION IS ASSOCIATED WITH ONCOGENIC MUTATIONS

K. V. Bogdanov^{1, *}, O. V. Merzlikina¹, Y. V. Mirolyubova¹, L. L. Girshova¹, E. G. Lomaia¹, and A. Y. Zaritskey¹

¹Institute of Oncology and Hematology, Federal Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341 Russia *e-mail: kvbogdanov@vandex.ru

.

In leukemia, dysfunction of the mitosis controlling genes involved in the correct segregation of sister chromatids in anaphase is often accompanied by aneuploidy. Kinetochore component AF15q14/KNL1/CASC5 ensures correct binding of the centromeric region of chromosomes to mitotic microtubules. In some leukemias with poor prognosis, chromosome translocation t(11;15)(q23;q14) leads to the fusion of *AF15q14* gene with *MLL*, resulting in the formation of chimeric oncogene *MLL-AF15Q14*. Despite the involvement of *CASC5* mRNA transcription in solid tumor oncogenesis, in malignant hematopoietic neoplasms the expression of this gene has not been studied yet. Here we analyzed expression levels of *CASC5* and some other regulatory genes, including *N-MYC*, *WT1*, *APOBEC3A* (*A3A*) and showed a significant decrease in the expression of *CASC5* in bone marrow cells collected from primary patients with leukemia as compared to healthy donors. In CML, AML, B-ALL, reduced expression of *CASC5* correlates with the detection of oncogenic mutations are confered with the prognostic subgroups (favorable, unfavorable) (p < 0.05). Altered expression of *CASC5* is associated with the overexpression of *WT1*, *A3A*, *N-MYC*, *SPT16*, and in the resistance to chemotherapy and AML progression. The question which regulatory gene is an actual driver of leukemogenesis warrants future investigation.

Keywords: leukemia, oncogenes, mutations, regulation, expression, CASC5, WT1, A3A, N-MYC

——— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ ——

УДК 577.2+577.29

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕЙРОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА МФТП У МЫШЕЙ С КОНСТИТУТИВНЫМ НОКАУТОМ ГЕНА АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА

© 2021 г. К. Д. Чапров^{*a*}, *, Е. В. Тетерина^{*a*}, А. Ю. Роман^{*a*}, Т. А. Иванова^{*a*}, В. В. Голоборщева^{*b*}, В. Г. Кучеряну^{*b*}, С. Г. Морозов^{*b*}, Е. А. Лысикова^{*a*}, О. А. Лыткина^{*a*}, И. В. Королева^{*a*}, Н. Я. Попова^{*c*}, А. И. Антохин^{*c*}, Р. К. Овчинников^{*a*}, ^{*c*}, М. С. Кухарский^{*a*}, ^{*c*}

^аИнститут физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, 142432 Россия ^bНаучно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия ^cРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, 117997 Россия

> *e-mail: chaprov@ipac.ac.ru Поступила в редакцию 08.07.2020 г. После доработки 23.08.2020 г. Принята к публикации 30.08.2020 г.

Агрегированные формы белка альфа-синуклеина являются структурообразующим компонентом патогистологических включений – телец Леви, в нейронах черной субстанции при болезни Паркинсона. С целью изучения роли альфа-синуклеина в избирательном поражении дофаминергических нейронов черной субстанции при болезни Паркинсона используют линии мышей с нокаутом этого гена. Новая линия мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина – delta flox KO, которая моделирует конечную форму генетического нокаута после прижизненной делеции гена альфа-синуклеина у мышей с регулируемым нокаутом, не содержит в модифицированном геномном локусе посторонних последовательностей, что отличает ее от всех других линий с нокаутом альфа-синуклеина. Нами проведен сравнительный анализ влияния нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), используемого для моделирования болезни Паркинсона, на мышей delta flox KO и на хорошо изученную линию с нокаутом гена альфа-синуклеина – AbKO. Показано, что введение МФТП по субхроническому протоколу, позволяющему моделировать ранние стадии болезни Паркинсона, приводило к снижению уровня дофамина и изменению соотношения его метаболитов в стриатуме мышей delta flox КО до такого же уровня, как у мышей AbKO и контрольных животных дикого типа. На фоне отсутствия выраженных двигательных расстройств у мышей, обработанных МФТП, в установке CatWalk XT ("Noldus") выявлены идентичные нарушения походки у животных обеих линий и у контрольных мышей дикого типа. Полученные данные указывают на то, что нейротоксическое поражение дофаминергических нейронов delta flox KO и AbKO развивается по сходному механизму.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, альфа-синуклеин, генетический нокаут, дофамин, МФТП DOI: 10.31857/S0026898421010031

ВВЕДЕНИЕ

Нарушениям структуры и функции белка альфа-синуклеина отводится важная роль в патогенезе болезни Паркинсона (БП) [1]. Выявление агрегированного альфа-синуклеина в составе телец Леви — патогистологических структурах в дофаминергических (ДА) нейронах черной субстанции (ЧС) при БП [1, 2], положило начало активному изучению функций этого белка и механизмов нарушений структуры, экспрессии и внутринейронной компартментализации альфасинуклеина, которые вызывают его агрегацию и формирование патогенных включений [3, 4]. Повышение концентрации альфа-синуклеина в цитоплазме ДА-нейронов, в первую очередь в составе растворимых промежуточных продуктов белковой агрегации, таких как олигомеры и протофибриллы, токсично для клеток и постепенно приводит к их гибели [5–9]. Агрегация белка и перевод его в нерастворимые депозиты позволяет снизить концентрацию токсичных форм альфа-синуклеина в цитоплазме и служит меха-

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; ДА – дофаминергические нейроны, ЧС – черная субстанция; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

низмом защиты долгоживущих нейронов. С другой стороны, продолжающиеся исследования показали, что агрегация новосинтезированного альфа-синуклеина и его накопление в составе цитоплазматических и аксональных включений сопровождается понижением концентрации функционального мономерного альфа-синуклеина в пресинаптических окончаниях [10]. При этом недостаточность функционального альфа-синуклеина наиболее выражена именно в пресинаптических окончаниях тех нейронов, которые наиболее эффективно нейтрализуют высокотоксичные, растворимые, промежуточные продукты агрегации альфасинуклеина, ускоряя их перевод в менее токсичные фибриллярные формы и образуя характерные патогистологические включения [11, 12].

Альфа-синуклеин в норме является пресинаптическим белком, он выполняет важную функцию в регуляции нейротрансмиссии, участвуя в сборке SNARE-комплексов в синапсах [13], в формировании и перераспределении пулов синаптических везикул [14, 15], расширении поглощающих мембранных пор [16], в высвобождении и захвате дофамина синаптическими везикулами [17, 18] и во многих других процессах. Результаты многочисленных исследований показали, что дефицит функционального альфа-синуклеина в синапсах ДА-нейронов снижает эффективность процессов трансмиссии дофамина и таким образом участвует в развитии дисфункции нигростриарной системы, поражение которой считается главным патологическим признаком БП [12, 19-21]. Альфа-синуклеин вовлечен и в механизмы формирования популяций ДА-нейронов в период онтогенетического развития [22]. Причем в развивающемся мозге мышей наибольший модулирующий эффект этот белок оказывает именно на ДА-нейроны ЧС и практически не участвует в процессах формирования популяции ДА-нейронов соседней анатомической структуры в среднем мозге – вентральной области покрышки, которая гораздо меньше подвержена дегенеративным процессам при БП [23]. Однако несмотря на многочисленные исследования, непосредственная роль альфа-синуклеина в механизмах избирательного поражения ДА-нейронов при БП не изучена. Недостаточность функции альфа-синуклеина активно изучается *in vivo* на генетически модифицированных животных, в первую очередь, на линиях мышей с нокаутом гена альфа-синуклеина [24–27]. Для моделирования специфического поражения ДА-нейронов и паркинсонического синдрома часто применяют нейротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) – липофильное соединение, способное эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер. МФТП – один из токсинов, наиболее часто используемых при моделировании экспериментального паркинсонического синдрома у живот-

ных. После системного введения МФТП попадает в астроциты. гле окисляется с участием моноаминоксидазы Б и превращается в сильнодействующий дофаминергический нейротоксин 1-метил-4-фенилпиридиний (МФП⁺) [28, 29], токсический метаболит, который, в силу своей структурной схожести с молекулой дофамина, абсорбируется ДА-нейронами с помощью дофаминергического транспортера (DAT) [30-32]. Это приводит к прогрессивной потере ДА-нейронов ЧС и снижению уровня дофамина в стриатуме, где располагаются синапсы ДА-нейронов [33-35]. Ранее было показано, что у мышей с нокаутом гена альфа-синуклеина изменена чувствительность ДА-нейронов ЧС к МФТП. Интересно, что в отсутствие альфа-синуклеина нейроны становятся резистентными к МФТП, а не более чувствительными к этому нейротоксину, как предполагалось. Такие выводы сделаны на основании результатов морфометрического подсчета числа клеток, окрашиваемых антителами против тирозингидроксилазы, в ЧС, где располагаются тела ДА-нейронов [19, 36, 37]. Ингибирование комплекса I дыхательной цепи митохондрий вызывает стремительное понижение концентрации АТР в стриатуме и ЧС, после чего ДАнейроны подвергаются апоптозу и некрозу [38, 39]. Для развития клинической картины паркинсонического синдрома у экспериментальных животных обычно применяют хроническое или субхроническое введение МФТП. Важная особенность этой модели, отличающая ее от других токсикологических моделей нейродегенеративных патологий [40-42] - топографическое соответствие потери нейронов в мозге экспериментальных мышей и у индивидов с БП [43]. Однако при этом у модельных мышей не формируются включения, подобные тельцам Леви, регистрируемые при БП [30]. Обработка МФТП мышей с нокаутом альфа-синуклеина вызывает гораздо менее выраженную потерю тел ДА-нейронов в ЧС, чем у контрольных животных дикого типа. Чем обусловлена повышенная устойчивость мышей с нокаутом гена альфа-синуклеина к нейротоксическому действию МФТП не установлено. При этом у животных с нокаутом наблюдается снижение уровня дофамина и изменение соотношения его метаболитов в стриатуме, что указывает на патологические изменения метаболизма дофамина в синапсах ДА-нейронов, которые располагаются в стриатуме [19, 36, 37]. Возможно, именно отсутствие альфа-синуклеина, на участие которого в регуляции нейротрансмиссии указывает целый ряд исследований [13–16], в частности, вовлеченность альфа-синуклеина в оптимизацию высвобождения и захвата дофамина синаптическими везикулами [17, 18] вносит определенный вклад в механимы патологии ДА-синапсов, при которой дольше сохраняются тела нейронов. Однако существует и другая гипотеза, согласно которой

нарушение дофаминового статуса в синапсах ДАнейронов при сохранении числа тел нейронов в ЧС может быть обусловлено влиянием не только гена альфа-синуклеина, но и других генов, чья экспрессия может меняться в результате генетических модификаций локуса при конструировании "нокаутных" животных. Наибольший скептицизм в интерпретации результатов с использованием мышей линий B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}/J [AbKO] [25] и В6:129-Snca^{tm1Sud}/J [ТаКО] [26] вызывает тот факт, что в результате модификаций локуса альфа-синуклеина в геном мышей этих линий были привнесены посторонние последовательности, в частности, бактериальный ген neo и активные эктопические промоторы, которые могли повлиять на регуляторные элементы других генов и модифицировать их экспрессию. Действительно, показано многократное повышение уровня экспрессии по крайней мере одного гена - мультимерина 1 (*Mmrn-1*), в нервной системе мышей АbKO [44]. Для минимизации неспецифических эффектов модификаций локуса альфа-синуклеина создана линия мышей B6(Cg)-Snca^{tm1.2Vlb}/J [delta flox KO], из генома которой после проведенных манипуляций с локусом удалены все посторонние последовательности [45, 46]. Эту линию не использовали ранее для моделирования паркинсонического синдрома.

В представленной работе проведен сравнительный анализ нейротоксического эффекта МФТП в линии мышей delta flox KO с наиболее часто используемым генетическим нокаутом гена альфасинуклеина — AbKO, и у животных с немодифицированным геномом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные животные. Линия мышей C57BL/6 получена из питомника Charles River UK. Линия с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина JAXMice 028559 B6(Cg)- $Snca^{tm1.2Vlb}/J - Snca^{\Delta flox}$, Snca delta flox, delta flox КО, Snca КО [27, 46], получена из лаборатории В.Л. Бухмана (Cardiff University, Великобритания). Линия JAXMice 003692 B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}/J – AbKO, получена из лаборатории A. Rosenthal (University of California, США) [25]. Все мыши получены на генетическом фоне C57Bl/6J. Колонии мышей (шесть групп по 12 самцов в каждой) содержали в условиях беспатогенного вивария при искусственно регулируемом 12-часовом цикле день/ночь и постоянной температуре 22°С. Контрольную группу формировали от общих гетерозиготных производителей.

Генотипирование мышей линии AbKO проводили, как описано у Abeliovich и соавт. [25] с использованием праймеров:

aS_ups: 5'-CAGCTCAAGTTCAGCCACGA-3';

AKoC2: 5'-AAGGAAAGCCGAGTGATGTAC-3'; NeoA: 5'-ATGGAAGGATTGGAGCTACG-3'.

Мышей линии delta flox КО генотипировали, как описано Ninkina и соавт. [27] с использованием праймеров:

A_Int1For: 5'-TGCTGGGCACAGTGTTGATTG-3'; A_Int1Rev: 5'-AAAGGCTGGGCTTCAAGCAG-3';

Cre_rev: 5'-CATGAGTACTTGTGGCTCAC-3'.

Работы с животными проводили в соответствии с приказом Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н "Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики".

Введение МФТП. Экспериментальным животным в возрасте 3 мес внутрибрюшинно вводили водный раствор МФТП (30 мг/кг в сутки, "Sigma-Aldrich", США) последовательно в течение 5 дней. Контрольной группе вводили физраствор (0.9% NaCl) [47, 48].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Через 21 день после последней инъекции МФТП животных забивали дислокацией шейных позвонков. образцы дорсальных стриатумов извлекали на холоду, анализировали содержание дофамина и его метаболитов, как описано ранее [49]. С этой целью гомогенизировали по 6-12 стриатумов в 300 мкл 0.06 М HClO₄, центрифугировали при 15000 g в течение 5 мин при температуре 4°С. В осадках определяли концентрацию белка с помощью стандартного набора Pierce^{тм} BCA Protein Assay Kit ("Thermo Scientific™", США). Супернатант (50 мкл) наносили на откалиброванную колонку с обращенной фазой 4.6 × × 150 мм C18 Microsorb MV[™] HPLC Column ("Varian Inc.", США) и измеряли с помощью электрохимического детектора Decade II Electrochemical Detector ("Antec Scientific", Нидерланды) с рабочим электродом из стеклоуглерода, настроенным на 0.7 В по отношению к Ag/AgCl электроду сравнения. Для измерения концентрации дофамина и его метаболитов в качестве подвижной фазы использовали раствор, состоящий из 12% (по объему) метанола, 0.1 М дигидрофосфата натрия, 2.4 мМ 1-октансульфокислоты и 0.68 MM EDTA, pH 3.1.

Поведенческое тестирование. Через 21 день после последней инъекции МФТП оценивали координацию движений и походку животных контрольных и экспериментальных групп.

Исследование координации движений. Животных помещали в центр квадратной сетки размером 30 × 30 см, состоящей из квадратов со стороной 5 мм и диаметром 0.5 мм. Регистрировали время удержания животного на перевернутой сетке над толстым слоем подстила на высоте 55 см. Животные, падающие раньше максимального времени тестирования (60 с), получали еще две попытки с интервалом 10 мин. В анализ брали лучший показатель из трех попыток [47—50]. Для анализа координации на вертикальном шесте животное помещали на верхнюю часть деревянного шеста высотой 50 см и диаметром 10 мм, регистрировали время спуска. В анализ брали наименьшее время из пяти попыток, выполненных с интервалом 5 мин [48, 50].

Исследование походки. Установка CatWalk XT ("Noldus", Нидерланды) включает подъемный коридор длиной 1.3 м и шириной 5 см, обеспечивающий свободное перемещение животного. Основанием коридора служит стеклянная пластина, пронизанная зеленым лазером, раскрывающимся в точках соприкосновения лапы животного со стеклянной пластиной [51]. Тестируемое животное равномерно пробегало по пластине несколько раз, в центральной зоне коридора длиной 45 см с помощью высокоскоростной камеры регистрировали контакты конечности с пластиной, характеризующие форму соприкосновения, площадь контакта и интенсивность нажатия [52]. Каждое животное проходило коридор 3 раза с последующим анализом по протоколу, рекомендованному производителем CatWalk XT 10.6 ("Noldus"). При тестировании использовали следующие установочные параметры съемки: интенсивность зеленого света дорожки 16.5 В; усиление камеры 20 дБ; порог зеленой интенсивности 0.1; красный потолочный свет 17.7 В; мыши весом 25-38 г, согласно протоколу для анализа походки.

Статистическая обработка. Статистическую обработку проводили с помощью программы GraphPad Prism Software 8.0 ("GraphPad Software Inc", США). Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки. Различия по исследуемому признаку считали статистически значимыми при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали полученные независимо в двух лабораториях линии мышей с нокаутом гена альфа-синуклеина (*Snca*). Модификации локуса альфа-синуклеина обозначены на рис. 1. В геноме мышей AbKO модификация локуса включает обширную делецию (3.2 т.п.н.) гена альфасинуклеина, в том числе некодирующий экзон Ib и второй экзон, в котором располагается инициирующий (старт)-кодон [25]. При этом в область делеции введены последовательности, входящие в состав таргетного вектора, используемого при проведении гомологической рекомбинации в эмбриональных стволовых клетках и отборе рекомбинантных клонов на основе приобретенной устойчивости к антибиотику неомицину (G418). Эта техника модификации генома широко используется при получении животных с нокаутом нужного гена. Далее внесенные последовательности могут быть либо удалены, либо оставлены, если это не влияет на активность других генов в окружении модифицированного локуса. Фрагмент ДНК, встроенный в геном мышей АbКО (1.9 т.п.н.), содержал бактериальный ген *пео* под контролем функционального промотора гена фосфоглицераткиназы мыши (*Pgk1*, без кодирующей части), помещенный эктопически в область второго интрона гена альфа-синуклеина (рис. 1). При этом промотор *Pgk1* ориентирован в направлении, противоположном направлению транскрипции гена альфа-синуклеина. В геноме мышей линии delta flox KO [27, 46] делеция участка гена альфа-синуклеина составляла 1.1 т.п.н, и включала второй экзон, в котором располагается старт-кодон (рис. 1). Небольшой фрагмент (34 п.н.), встроенный в модифицированный локус, является сайтом узнавания Сге-рекомбиназы – LoxP. LoxP.

Сформированы репрезентативные синхронизированные группы самцов (n = 24) двух генотипов с нокаутом и контрольных мышей дикого типа, после чего проведен дополнительный анализ модификаций локуса альфа-синуклеина с использованием соответствующих пар праймеров, как обозначено на рис. 1а. Праймеры подбирали таким образом, чтобы один располагался в делетируемой области и мог направлять амплификацию продукта только в присутствии аллеля дикого типа (рис. 16). Так, в геномной ДНК мышей АЬКО с делецией второго экзона гена альфа-синуклеина выявлен единственный фрагмент размером 450 п.н., в случае немодифицированного локуса (WT) фрагмент состоял из 520 п.н. У мышей линии delta flox KO на геномной ДНК с модифицированным локусом альфа-синуклеина амплифицировался фрагмент размером 280 п.н., а у контрольных животных дикого типа (WT) – фрагмент 354 п.н. (рис. 1б).

С целью изучения чувствительности к МФТП мышам в возрасте 10 недель (половина животных каждой из трех групп) ежедневно вводили МФТП в дозе 30 мг/кг веса в течение 5 дней, после чего следовал восстановительный период (21 день) для нивелирования прямого травматического токсического эффекта нейротоксина. После восстановительного периода у мышей сохранялись только долгосрочные изменения, связанные с необратимым поражением нигростриарной системы. В данном субхроническом протоколе [47, 48] общая кумулятивная доза МФТП и метод введения подобраны таким образом, чтобы поражалась только часть дофаминергических нейронов ЧС. При этом функция погибших нейронов могла быть компенсирована. Для подтверждения эффективной компенсации на 20-й и 21-й дни после последней инъекции МФТП оценивали двигательную функцию мышей в экспериментальных и контрольных группах. В классических тестах, та-



Рис. 1. Модификации локуса альфа-синуклеина в геноме двух линий мышей, *a* — Схема удаления экзона II, содержащего старт-кодон, в линиях B6;129X1-Snca^{tm1Rosl}/J [AbKO] и B6(Cg)-Snca^{tm1.2Vlb}/J [delta flox KO]. Стрелкой указано направление транскрипции гена *neo*. Положение праймеров для генотипирования обозначено полустрелками. Жирными полустрелками обозначены праймеры для анализа колонии delta flox KO, тонкими — колонии AbKO. *б* — Выявление модификаций локуса альфа-синуклеина методом ПЦР.



Рис. 2. Анализ двигательной функции мышей через 21 день после введения МФТП. *а* – Время удержания на перевернутой сетке. *б* – Время спуска по вертикальному шесту. Значения в группах рассчитывали по результатам трех независимых тестирований каждого животного. "+" – МФТП и "–" – Контроль. *M* ± SEM, *n* = 8 в каждой из шести групп. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

ких как способность удерживаться на перевернутой сетке и спускаться по вертикальному шесту, ни в одной из экспериментальных групп не выявлено статистически значимых отклонений от показателей у контрольных животных, не обработанных МФТП (рис. 2). Время, которое животные удерживались на перевернутой сетке, было близким ко времени тестирования (60 с) во всех группах (рис. 2a), что указывало на отсутствие существенных нарушений мышечной силы конечностей и координации движений. Анализ способности животных спускаться по вертикальному шесту также не выявил статистически значимых

различий между обработанными МФТП и контрольными животными. И хотя наблюдалась тенденция к увеличению общего времени спуска с шеста у животных, получавших МФТП (6.00 ± 1.10), различия в показателях не были статистически значимыми (рис. 2δ).

Уровни дофамина и его метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в тканях стриатума, поскольку в стриатуме располагаются синапсы ДАнейронов ЧС, и там осуществляется трансмиссия дофамина. Отдельно препарировали и анализи-



Рис. 3. ВЭЖХ-анализ уровней дофамина и его метаболитов в стриатуме мышей через 21 день после введения МФТП. a -Содержание дофамина в стриатуме мышей дикого типа (WT) и линий с нокаутом альфа-синуклеина – AbKO и delta flox KO; δ – соотношение общего содержания метаболитов дофамина 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) и уровня стриарного дофамина. $M \pm$ SEM, n = 8 в каждой из шести групп; *p < 0.05; **p < 0.01; **** p < 0.0001. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

ровали стриатумы из каждого полушария головного мозга, как описано ранее [49]. На рис. 3 представлены результаты измерения уровней стриарного дофамина и его метаболитов у мышей дикого типа и обеих линий с нокаутом альфа-синуклеина. Нами выявлено статистически значимое снижение уровней дофамина у мышей всех групп после обработки нейротоксином МФТП. При этом падение уровня дофамина в стриатуме животных линий delta flox KO (0.325 ± 0.02463) и AbKO (0.3950 ± 0.02603) было практически одинаковым и не отличалось от двукратного падения уровня дофамина в стриатуме мышей дикого типа (0.3314 ± 0.04257) (рис. 3).

В тех же образцах определено содержание метаболитов дофамина: продукта его окислительного дезаминирования 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и основного конечного метаболита дофамина - гомованилиновой кислоты (ГВК). Соотношение содержания продуктов катаболизма дофамина и интактных молекул дофамина во всех образцах было повышено: 0.1875 ± 0.01297 у мышей AbKO, 0.2041 ± 0.01003 у delta flox KO и 0.1925 ± 0.01382 у WT. Это указывало на то, что количество молекул дофамина, утилизируемых в синаптических окончаниях ДА-нейронов, превышало количество новосинтезированного дофамина. Такие изменения в показателях катаболизма стриарного дофамина обусловлены гибелью тел части ДА-нейронов ЧС. При этом сравнительный анализ содержания дофамина и его метаболитов в стриатумах мышей линий delta flox КО и AbKO показал идентичность повреждающего эффекта МФТП на дофаминовый статус (рис. 3).

В тех же образцах методом ВЭЖХ определены уровни другого переносчика моноаминов — серотонина (рис. 4). Не выявлено статистически значимого падения уровня серотонина после обработки МФТП ни у мышей AbKO (0.03039 ± 0.002174), ни у мышей delta flox KO (0.02496 ± 0.001867), ни у мышей дикого типа (0.02730 ± 0.001649). Эти данные указывают на специфичность токсического поражения именно тел ДА-нейронов в ЧС.

С целью отработки метода выявления влияния нарушения дофаминового статуса при компенсированном поражении МФТП на координацию движений проведен детальный инструментальный анализ походки мышей в установке CatWalk XT ("Noldus") (рис. 5 и 6). Тестирование проводили на 20-й и 21-й дни после последнего введения МФТП.

Данная установка позволяет регистрировать до 200 параметров, характеризующих походку животных. Выявлены изменения ряда показателей походки в группах мышей, обработанных МФТП. Наиболее выраженными были изменения интенсивности и формы контакта конечности с пластиной аппарата при ходьбе. В частности, у мышей, получавших МФТП, интенсивность давления конечности на поверхность снижалась в среднем на 20%. Причем снижение этого показателя наблюдалось на всех четырех конечностях. Важно отметить, что у мышей обеих "нокаутных" линий выраженность эффекта ослабления контакта конечности с поверхностью была одинаковой (рис. 5).



Рис. 4. ВЭЖХ-анализ уровней серотонина в стриатуме мышей через 21 день после введения МФТП. Содержание серотонина у WT-мышей и у мышей линий AbKO и delta flox KO с нокаутом. $M \pm$ SEM, n = 8 в каждой из шести групп. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

Для примера приведен другой параметр — расстояние между шагами по разным осям движения тела мыши, которое также менялось, однако отсутствовала строгая закономерность, количественно описывающая общую для всех групп особенность нарушения походки (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе проведено сравнение чувствительности ДА-нейронов ЧС мозга двух линий мышей с конститутивным нокаутом гена альфасинуклеина. Главное отличие этих линий заключается в том, что геном мышей АbKO содержит посторонние последовательности, использованные для модификации локуса гена альфа-синуклеина методом гомологической рекомбинации с применением эмбриональных стволовых клеток мыши. Эти последовательности, включающие, в частности, бактериальный ген пео и активный эктопический промотор гена *Pgk1*. не были удалены из модифицированного локуса (рис. 1). Нельзя исключить, что активный промотор Pgk1 может влиять на регуляторные элементы других генов в окружении локуса альфа-синуклеина, и это, в свою очередь, будет затруднять интерпретацию результатов изучения функции и дисфункции альфа-синуклеина с применением данной линии мышей. Действительно, недавно показали, что в тканях нервной системы мышей АbKO существенно повышена экспрессия гена мультимерина 1 (Mmrn-1) [44]. Единственный конститутивный нокаут альфа-синуклеина, при котором модифицированный локус не содержит функционально значимых посторонних последовательностей – линия delta flox KO, полученная с помощью технологии Сге-рекомбинации для регулируемого генетического нокаута альфа-синуклеина [27, 46]. В результате модифицированный локус генома мышей delta flox KO не содержит никаких привнесенных регуляторных последовательностей. Единственная такая последовательность – небольшой фрагмент размером 34 п.н., являющийся сайтом узнавания Сге-рекомбиназы – LoxP. LoxP. Эти сайты широко используются для конструирования регулируемых нокаутов и считаются безопасными, поскольку за все время применения данной технологии не выявлено влияния последовательностей LoxP на активность кодирующих и регуляторных участков генома [53].



Рис. 5. Анализ походки мышей в установке CatWalk XT ("Noldus"). Интенсивность давления конечности на пластину аппарата при ходьбе (усл. ед.). "+" – введен МФТП; "–" – не введен МФТП. $M \pm \text{SEM}$, n = 8 в каждой из шести групп; ****p < 0.0001. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.



Рис. 6. Анализ походки мышей в установке CatWalk XT ("Noldus"). Сокращение расстояния между шагами (расстояние между положением задней и ранее размещенной передней лапы на одной стороне тела в одном и том же шаговом цикле) по разным осям движения тела мыши после введения МФТП. a - Правая, $\delta - левая$ ось движения тела мыши. "+" – введен МФТП; "–" – не введен МФТП. $M \pm SEM$, n = 8 в каждой из шести групп; * p < 0.05; ** p < 0.01. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с применением критерия множественных сравнений Тьюки.

Сравнительное исследование чувствительности мышей delta flox KO и AbKO к нейротоксину МФТП проводили на репрезентативных группах животных с нокаутом гена альфа-синуклеина и контрольных животных дикого типа с немодифицированным геномом. Применение субхронического протокола введения МФТП [47, 48] позволяло моделировать клиническую картину ранней стадии БП, когда поражается только часть ДА-нейронов ЧС, а утрата их функции компенсирована. Действительно, у мышей всех экспериментальных групп на 20-й день после обработки нейротоксином МФТП восстанавливалась двигательная функция, что показано с помощью двух простых классических тестов, используемых для характеристики грубых расстройств движений и их координации. Так, ни способность удерживаться на перевернутой сетке, ни время спуска по вертикальному шесту у животных, обработанных МФТП, не отличались от показателей у животных контрольных групп, что указывало на компенсированный характер повреждений, вызванных МФТП (рис. 2). Однако у животных всех групп, получавших МФТП, нами выявлено статистически значимое снижение уровней дофамина в стриатуме головного мозга, где локализованы синапсы ДА-нейронов ЧС и осуществляется трансмиссия дофамина (рис. 3). При этом снижение уровня дофамина, определенное методом ВЭЖХ, у мышей AbKO было практически таким же, как и в стриатуме мышей дикого типа (рис. 3). Эти результаты согласуются с опубликованными paнee Ninkina и соавт. данными анализа линии AbKO [49] и указывают на потерю ДА-нейронов вследствие поражения нейротоксином МФТП. Следует отметить, что токсичность МФТП на мышах линии delta flox KO ранее не изучали. Нами показано, что базовый уровень дофамина в стриатуме этих мышей оказался близким к его уровню у животных широко используемой и хорошо исследованной линии AbKO. Обработка мышей delta flox KO нейротоксином приводила к падению стриарного дофамина как у мышей Ab-КО, как и у мышей дикого типа. Более того, выявлено повышение соотношения продуктов катаболизма дофамина (ДОФУК и ГВК) и интактных молекул дофамина во всех образцах. Т.е. количество утилизируемых молекул дофамина в синаптических окончаниях ДА-нейронов превышало количество вновь синтезируемого дофамина, что связано с гибелью тел части популяции ДА-нейронов ЧС, вызванной специфическим токсическим действием МФТП. Причем выраженность поражения была одинаковой в обеих линиях с нокаутом гена альфа-синуклеина и у контрольных животных дикого типа (рис. 3). При этом специфичность токсического поражения ДА-нейронов подтверждается отсутствием изменений в уровнях другого трансмиттера моноаминов – серотонина (рис. 4). Таким образом, нами показано, что уровень дефицита дофамина, обусловленный ответом на введение нейротоксина МФТП, соответствует ранней стадии БП, характеризующейся эффективной компенсацией недостаточности дофамина и отсутствием выраженной клинической симптоматики поражения ДА-системы [54–56].

Следующей задачей была отработка метода регистрации нарушения координации движений у мышей при изменении дофаминового статуса, обусловленного токсическим поражением ДАнейронов МФТП. В условиях нашей токсической модели ранней стадии БП у мышей всех экспериментальных групп отсутствовали видимые двигательные нарушения, а также признаки моторных дисфункций в большинстве простых рутинных тестов, применяемых для анализа двигательной функции. Нарушение походки является одним из основных диагностических признаков БП. Изменение походки отмечается уже на относительно ранних стадиях БП даже в отсутствие других выраженных двигательных расстройств и тремора [57. 58]. Поэтому мы использовали установку CatWalk XT ("Noldus"), позволяющую подробно количественно оценить особенности походки мышей по 200 параметрам (рис. 5 и 6). Наиболее значимым было отклонение в показателях интенсивности давления конечности на поверхность пластины аппарата. Ослабление давления выявлено у мышей обеих линий с нокаутом и у мышей дикого типа, при этом выраженность эффекта ослабления контакта конечности с поверхностью была одинаковой. Средний вес мышей в группах, обработанных МФТП, был таким же, как у не обработанных МФТП контрольных животных, поэтому описанные изменения интенсивности давления конечности на поверхность пластины аппарата не связаны с весом мышей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании моделирование компенсированного паркинсонического синдрома выполнено на двух независимых линиях мышей с генетическим нокаутом альфа-синуклеина (delta flox KO и AbKO) путем введения нейротоксина МФТП по субхроническому протоколу. Ранее нейротоксический эффект у мышей delta flox KO не изучали. Показано, что МФТП вызывает снижение уровня дофамина и изменение соотношения его метаболитов в стриатуме мышей обеих линий до одинакового уровня. Тестирование мышей delta flox KO и AbKO в установке CatWalk XT ("Noldus") выявило идентичные нарушения походки по показателю интенсивности давления конечности на поверхность пластины аппарата. Полученные данные позволяют заключить, что у мышей delta flox KO и AbKO с нокаутом гена альфа-синуклеина компенсированный паркинсонический синдром развивается по сходному механизму. Это актуально, поскольку линия delta flox КО фактически моделирует конечную форму генетического нокаута при прижизненной делеции гена альфа-синуклеина у мышей с регулируемым нокаутом этого гена. До настоящего времени линия delta flox KO остается единственной линией мышей для кондиционной инактивации альфа-синуклеина. Кроме того, выявленное нами нарушение походки у мышей с измененным дофаминовым статусом в отсутствие выраженной двигательной патологии – изменение интенсивности давления конечности на пластину в аппарате Cat-Walk, может использоваться для оценки эффективности разрабатываемых противопаркинсонических соединений.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00064), поведенческое тестирование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-315—90049 с использованием оборудования ЦКП ИФАВ РАН.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Peters O., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. (2012) Протеинопатии – формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков. *Молекуляр. биология.* 46, 402–415.
- Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 388(6645), 839–840.
- 3. Emamzadeh F.N., Surguchov A. (2018) Parkinson's disease: biomarkers, treatment, and risk factors. *Front. Neurosci.* **12**, 612.
- Goedert M., Jakes R., Spillantini M.G. (2017) The synucleinopathies: twenty years on. J. Parkinsons. Dis. 7(s1), S51–S69.
- 5. Caughey B., Lansbury P.T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267–298.
- 6. Dev K.K., Hofele K., Barbieri S., Buchman V.L., van der Putten H. (2003) Part II: alpha-synuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology.* **45**, 14–44.
- 7. Fink A.L. (2006) The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Acc. Chem. Res.* **39**, 628–634.
- 8. Uversky V.N. (2007) Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J. Neurochem.* **103**, 17–37.
- 9. Uversky V.N. (2017) Looking at the recent advances in understanding α -synuclein and its aggregation through the proteoform prism. *F1000Res.* **6**, 525.
- Osterberg V.R., Spinelli K.J., Weston L.J., Luk K.C., Woltjer R.L., Unni V.K. (2015) Progressive aggregation of alpha-synuclein and selective degeneration of lewy inclusion-bearing neurons in a mouse model of parkinsonism. *Cell Rep.* 10, 1252–1260.
- 11. Ingelsson M. (2016) Alpha-synuclein oligomers-neurotoxic molecules in Parkinson's disease and other lewy body disorders. *Front. Neurosci.* **10**, 408.
- Venda L.L., Cragg S.J., Buchman V.L., Wade-Martins R. (2010) α-Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 33, 559–568.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

160

- Burré J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M.R., Südhof T.C. (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro*. *Science*. 329(5999), 1663–1667.
- Cabin D.E., Shimazu K., Murphy D., Cole N.B., Gottschalk W., McIlwain K.L., Orrison B., Chen A., Ellis C.E., Paylor R., Lu B., Nussbaum R.L. (2002) Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 22, 8797– 8807.
- Fusco G., Pape T., Stephens A.D., Mahou P., Costa A.R., Kaminski C.F., Kaminski Schierle G.S., Vendruscolo M., Veglia G., Dobson C.M., De Simone A. (2016) Structural basis of synaptic vesicle assembly promoted by α-synuclein. *Nat. Commun.* 7, 12563.
- Logan T., Bendor J., Toupin C., Thorn K., Edwards R.H. (2017) α-Synuclein promotes dilation of the exocytotic fusion pore. *Nat. Neurosci.* 20, 681–689.
- Ganapathy K., Datta I., Sowmithra S., Joshi P., Bhonde R. (2016) Influence of 6-hydroxydopamine toxicity on α-synuclein phosphorylation, resting vesicle expression, and vesicular dopamine release. *J. Cell Biochem.* 117, 2719–2736.
- Нинкина Н.Н., Тарасова Т.В., Чапров К.Д., Голоборщева В.В., Бачурин С.О., Бухман В.Л. (2019) Дефицит синуклеинов снижает эффективность захвата дофамина синаптическими везикулами. ДАН. 486(1), 114–117.
- Al-Wandi A., Ninkina N., Millership S., Williamson S.J., Jones P.A., Buchman V.L. (2010) Absence of alpha-synuclein affects dopamine metabolism and synaptic markers in the striatum of aging mice. *Neurobiol. Aging.* 31(5), 796–804.
- Benskey M.J., Perez R.G., Manfredsson F.P. (2016) The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function – implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 137, 331–359
- Collier T.J., Eugene Redmond D., Steece-Collier K., Lipton J.W., Manfredsson F.P. (2016) Is alpha-synuclein loss-of-function a contributor to parkinsonian pathology? Evidence from non-human primates. *Front. Neurosci.* 10, 12.
- Тарасова Т.В., Лыткина О.А., Роман А.Ю., Бачурин С.О., Устюгов А.А. (2016) Роль альфа-синуклеина в развитии дофаминергических нейронов черной субстанции и области вентральной покрышки среднего мозга. ДАН. 466(5), 620–623.
- Tarasova T.V., Lytkina O.A., Goloborshcheva V.V., Skuratovskaya L.N., Antohin A.I., Ovchinnikov R.K., Kukharsky M.S. (2018) Genetic inactivation of alphasynuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra, but not the ventral tegmental area, in mouse brain. *PeerJ.* 6, e4779.
- Buchman V.L., Ninkina N. (2008) Modulation of αsynuclein expression in transgenic animals for modelling synucleinopathies - Is the juice worth the squeeze? *Neurotox Res.* 14, 329–341.
- Abeliovich A., Schmitz Y., Fariñas I., Choi-Lundberg D., Ho W.H., Castillo P.E., Shinsky N., Verdugo J.M., Ar-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 55 № 1 2021

manini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A. (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron.* **25**, 239–252.

- Schlüter O.M., Fornai F., Alessandrí M.G., Takamori S., Geppert M., Jahn R., Südhof T.C. (2003) Role of alphasynuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *Neuroscience*. 118, 985–1002.
- 27. Ninkina N., Connor-Robson N., Ustyugov A.A., Tarasova T.V., Shelkovnikova T.A., Buchman V.L. (2015) A novel resource for studying function and dysfunction of α -synuclein: mouse lines for modulation of endogenous *Snca* gene expression. *Sci. Rep.* **5**, 16615.
- Бачурин С.О., Саблин С.О., Гришина Г.В., Гайдарова Е.Л., Дубова Л.Г., Зубов Н.Д. (1989) Каталитическая биотрансформация физиологически активных 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридинов под действием моноаминооксидазы. Биоорган. химия. 15(5), 620–626.
- 29. Sablin S.O., Krueger M.J., Bachurin S.O., Solyakov L.S., Efange S.M.N., Singer T.P. (1994) Oxidation products arising from the action of monoamine oxidase B on 1-methyl-4-benzyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, a nonneurotoxic analogue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.* **62**(5), 2012–2016.
- Schober A. (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318(1), 215–224.
- Martí Y., Matthaeus F., Lau T., Schloss P. (2017) Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) differentially affects monoamine release and re-uptake in murine embryonic stem cell-derived dopaminergic and serotonergic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 83, 37–45.
- 32. Бачурин С.О., Лукоянов Н.В., Петрова Л.Н., Соляков Л.С., Ткаченко С.Е., Раевский О.А. (1996) Ингибирование системы обратного захвата дофамина аналогами нейротоксического метаболита МФП (1-метил-4-фенилпиридиний). Связь структура–активность. ДАН. 346(4), 549–551.)
- Bezard E., Gross C.E., Fournier M.C., Dovero S., Bloch B., Jaber M. (1999) Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp. Neurol.* 155, 268–273.
- Ugrumov M. (2020) Development of early diagnosis of Parkinson's disease: illusion or reality? *CNS Neurosci. Ther.* 00, 1–13.
- 35. Руденок М.М., Алиева А.Х., Николаев М.А., Колачева А.А., Угрюмов М.В., Пчелина С.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И. (2019) Возможная рольгенов, связанных с лизосомными болезнями накопления, в патогенезе болезни Паркинсона. Молекуляр. биология. 53, 28–36.
- Chia S.J., Tan E.K., Chao Y.X. (2020) Historical perspective: models of Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21(7), 2464.
- Thomas B., Mandir A.S., West N., Liu Y., Andrabi S.A., Stirling W., Dawson V.L., Dawson T.M., Lee M.K. (2011) Resistance to MPTP-neurotoxicity in α-synuclein knockout mice is complemented by human α-sy-

nuclein and associated with increased β -synuclein and Akt activation. *PLoS One.* **6**(1), e16706.

- Sayre L.M., Wang F., Hoppel C.L. (1989) Tetraphenylborate potentiates the respiratory inhibition by the dopaminergic neurotoxin MPP+ in both electron transport particles and intact mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 809–818.
- Bachurin S.O., Shevtzova E.P., Lermontova N.N., Serkova T.P., Ramsay R.R. (1996) The effect of dithiocarbamates on the neurotoxic action of 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and on mitochondrial respiratory chain. *Neurotoxicology*. 17(3–4), 897–904.
- Lermontova N., Lukoyanov N., Serkova T., Lukoyanova E., Bachurin S. (1998) Effects of tacrine on deficits in active avoidance performance induced by AF64A in rats. *Mol. Chem. Neuropathol.* 33(1), 51–61.
- Milaeva E.R., Gerasimova O.A., Jingwei Z., Shpakovsky D.B., Syrbu S.A., Semeykin A.S., Koifman O.I., Kireeva E.G., Shevtsova E.F., Bachurin S.O., Zefirov N.S. (2008) Synthesis and antioxidative activity of metalloporphyrins bearing 2,6-di-tert-butylphenol pendants. *J. Inorg. Biochem.* **102**(5–6), 1348–1358.
- Perlovich G.L., Proshin A.N., Volkova T.V., Petrova L.N., Bachurin S.O. (2012) Novel 1,2,4-thiadiazole derivatives as potent neuroprotectors: approach to creation of bioavailable drugs. *Mol. Pharm.* 9(8), 2156–2167.
- Petroske E., Meredith G.E., Callen S., Totterdell S., Lau Y.S. (2001) Mouse model of Parkinsonism: A comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/ probenecid treatment. *Neuroscience*. **106**, 589–601.
- 44. Чапров К.Д., Голоборщева В.В., Тарасова Т.В., Тетерина Е.В., Корокин М.В., Солдатов В.О., Покровский М.В., Кучеряну В.Г., Морозов С.Г., Овчинников Р.К. (2020) Повышение экспрессии гена мультимерина-1 в нервной системе мышей как результат геномной модификации локуса альфа-синуклеина. ДАН. 494, 537–540.
- 45. Тарасова Т.В., Устюгов А.А., Нинкина Н.Н., Скворцова В.И (2016) Новая линия генетически модифицированных мышей с конститутивным нокаутом гена альфа-синуклеина для изучения патогенетических аспектов дифференциального поражения дофаминергических нейронов. Патол. Физиол. Эксп. Тер. 60(3), 4–9.
- Roman A.Y., Limorenko G., Ustyugov A.A., Tarasova T.V., Lysikova E.A., Buchman V.L., Ninkina N. (2017) Generation of mouse lines with conditionally or constitutively inactivated *Snca* gene and Rosa26-stoplacZ reporter located in cis on the mouse chromosome 6. *Transgenic Res.* 26(2), 301–307.
- Robertson D.C., Schmidt O., Ninkina N., Jones P.A., Sharkey J., Buchman V.L. (2004) Developmental loss and resistance to MPTP toxicity of dopaminergic neurones in substantia nigra pars compacta of gamma-synuclein, alpha-synuclein and double alpha/gamma-synuclein null mutant mice. *J. Neurochem.* 89(5), 1126– 1136.
- Anwar S., Peters O., Millership S., Ninkina. N., Doig N., Connor-Robson N., Threlfell S., Kooner G., Dea-

con R.M., Bannerman D.M., Bolam J.P., Chandra S.S., Cragg S.J., Wade-Martins R., Buchman V.L. (2011) Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J. Neurosci.* **31**(20), 7264–7274.

- 49. Ninkina N., Tarasova T.V., Chaprov K.D., Roman A.Y., Kukharsky M.S., Kolik L.G., Ovchinnikov R., Ustyugov A.A., Durnev A.D., Buchman V.L. (2020) Alterations in the nigrostriatal system following conditional inactivation of α -synuclein in neurons of adult and aging mice. *Neurobiol. Aging.* **91**, 76–87.
- Connor-Robson N., Peters O.M., Millership S., Ninkina N., Buchman V.L. (2016) Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism. *Neurobiol. Aging.* 46, 107–112.
- 51. Minakaki G., Canneva F., Chevessier F., Bode F., Menges S., Timotius I.K., Kalinichenko L.S., Meixner H., Müller C.P., Eskofier B.M., Casadei N., Riess O., Schröder R., Winkler J., Xiang W., von Hörsten S., Klucken J. (2019) Treadmill exercise intervention improves gait and postural control in alpha-synuclein mouse models without inducing cerebral autophagy. *Behav. Brain Res.* 363, 199–215.
- Zimprich A., Östereicher M.A., Becker L., Dirscherl P., Ernst L., Fuchs H., Gailus-Durner V., Garrett L., Giesert F., Glasl L., Hummel A., Rozman J., de Angelis M.H., Vogt-Weisenhorn D., Wurst W., Hölter S.M. (2018) Analysis of locomotor behavior in the German Mouse Clinic. J. Neurosci. Meth. 300, 77–91.
- 53. Song A.J., Palmiter R.D. (2018) Detecting and avoiding problems when using the Cre–lox system. *Trends Genet.* **34**(5), 333–340.
- Колачева А.А., Угрюмов М.В. (2018) Минтез дофамина как механизм пластичности мозга при паталогии нигростриарной системы. ДАН. 479(3), 336– 339.
- 55. Сафандеев В.В., Колачева А.А., Иванов Д.Е., Угрюмов М.В (2017) Выявление латентной функциональной недостаточности дофаминергических нейронов нигростриарной системы на хронической модели болезни Паркинсона. *Нейрохимия*. **34**(4), 290–295.
- 56. Козина Е.А., Колачева А.А., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Хаиндрава В.Г., Угрюмов М.В. (2016) Хронические модели доклинической и ранней клинической стадии болезни Паркинсона на мышах. *Нейрохимия*. **33**(3), 222–229.
- 57. Рождественский А.С., Делов Р.А., Маркс Е.А., Гапоненко И.А., Ханох Е.В., Рождественский В.А., Иллариошкин С.Н. (2020) Изучение фундаментальных и прикладных аспектов болезни Паркинсона в рамках международного консорциума GEOPD. *Нервные болезни.* 1, 10–15.
- Чигалейчик Л.А., Карабанов А.В., Полещук В.В., Иллариошкин С.Н (2018) Современные технологии изучения постуральных нарушений при болезни Паркинсона. Вестн. Росс. Военно-мед. акад. S3, 116–117.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE MPTP NEUROTOXICITY IN MICE WITH CONSTITUTIVE KNOCKOUT OF ALPHA-SYNUCLEIN GENE

K. D. Chaprov^{1, *}, E. V. Teterina¹, A. Y. Roman¹, T. A. Ivanova¹, V. V. Goloborshcheva²,
V. G. Kucheryanu², S. G. Morozov², E. A. Lysikova¹, O. A. Lytkina¹, I. V. Koroleva¹,
N. Ia. Popova³, A. I. Antohin³, R. K. Ovchinnikov^{1, 3}, and M. S. Kukharsky^{1, 3}

¹Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia ²Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia ³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia *e-mail: chaprov@ipac.ac.ru

Aggregated forms of alpha-synuclein are core components of pathohistological inclusions, Lewy bodies in neurons of substantia nigra of Parkinson disease (PD) patients. The exact role of alpha-synuclein in mechanisms of selective loss of substantia nigra's dopaminergic neurons in PD brain remains obscure. Here we report the comparative analysis of effect of MPTP, a neurotoxin that affects the dopaminergic neurons, in two independently produced alpha-synuclein knockout mouse lines: delta flox KO and AbKO. MPTP treatment led to reduced level of striatum's dopamine and changed ratio of its metabolites equally in mice of both knockout lines. The gait analysis in CatWalk XT (Noldus) system revealed the identical changes. Delta flox KO line reproduces the end point of *in vivo* deletion of alpha-synuclein gene in mice with conditional alpha-synuclein knockout. Our data suggest that the main features of progression of the compensated parkinsonism syndrome in MPTP treated mice are the same in the delta flox KO and in the commonly used conventional knockout AbKO mice. The described parameter of gait deviation in mice could by applied for characteristic of therapeutic efficacy compounds for treatment of PD on early stages.

Keywords: Parkinson disease, alpha synuclein, genetic knockout, dopamine, MPTP

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 57.042

ГЛИКОЛЕВЫЕ И ФОСФАТНЫЕ ДЕПО-ФОРМЫ 4- И/ИЛИ 5-МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ, ПРОЯВЛЯЮЩИХ ПРОТИВОБАКТЕРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2021 г. С. Д. Негря^a, М. В. Ясько^a, Д. А. Макаров^{a, d}, П. Н. Сольев^a, И. Л. Карпенко^a,
 О. В. Шевченко^a, О. В. Чехов^{a, c}, А. А. Глухова^b, Б. Ф. Васильева^b, Т. А. Ефименко^b,
 И. Г. Сумарукова^b, О. В. Ефременкова^b, С. Н. Кочетков^a, Л. А. Александрова^a, *

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия ^bHayчно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия ^cМосковский физико-технический институт (государственный университет) Долгопрудный, Московская область, 141700 Россия

^d Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Высший химический колледж Российской академии наук, Москва, 125047 Россия

> *e-mail: ala2004_07@mail.ru Поступила в редакцию 19.05.2020 г. После доработки 24.06.2020 г. Принята к публикации 25.06.2020 г.

Возникновение резистентности к большинству препаратов, применяемых при инфекционных заболеваниях, требует создания новых соединений, эффективных в отношении лекарственно-устойчивых штаммов патогенов. Недавно мы синтезировали несколько групп модифицированных нуклеозидов, показавших значительную противобактериальную активность in vitro, однако их дальнейшее изучение затрудняла низкая растворимость в водных средах. В связи с этим мы синтезировали соединения, хорошо растворимые в водно-органических средах, которые оказались более эффективными ингибиторами роста грамположительных бактерий и микобактерий. Мы предположили, что рассмотренные в настоящем сообщении растворимые формы модифицированных нуклеозидов представляют собой их депо-формы. Для подтверждения этого предположения изучена способность этих соединений гидролизоваться в различных средах, а также проведен молекулярный докинг соединений в активный центр предполагаемого белка-мишени – флавинзависимой тимидилатсинтазы Mycobacterium tuberculosis (ThyX). Результаты компьютерного моделирования показали, что водорастворимые производные не являются ингибиторами тимидилатсинтазы ThvX. что может подтвердить наше предположение о действии производных нуклеозидов как депо-форм. Соединения были устойчивы к химическому гидролизу, но гидролизовались и карбоксилэстеразой печени свиньи, и в сыворотке крови человека, а также при инкубации со Staphylococcus aureus 209P. Полученные данные позволяют со значительной долей уверенности утверждать, что изученные соединения являются депо-формами модифицированных нуклеозидов.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, противовирусная и противобактериальная активность, модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды, пролекарство, депо-форма лекарственных препаратов, тимидилатсинтаза *Mycobacterium tuberculosis*

DOI: 10.31857/S0026898421010122

ВВЕДЕНИЕ

Одно из важнейших достижений медицины XX века — широкое использование противовирусных и противобактериальных средств, позволило значительно облегчить протекание инфекционных заболеваний и существенно снизить смертность. Однако в настоящее время большая часть патогенных бактерий и вирусов выработала резистентность к используемым в клинике лекарственным препаратам [1], в частности, появились новые штаммы возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (MDR) и широкой лекарственной устойчивостью (XDR) [2].

Нуклеотиды и нуклеозиды — это не только основные структурные единицы ДНК и РНК, они также принимают участие в различных биохимических реакциях. В связи с этим даже небольшие модификации нуклеинового основания или углеводного фрагмента нуклеозида могут оказывать существенное влияние на узнавание и ингибиро-

ственное средство, которое подвергается трансвание соответствующих ферментов и/или рецепторов, и, как следствие, на его активность формации in vivo вследствие химического или как антипатогена. На сегодняшний день аналоги ферментативного расщепления. Такой подход, с и производные нуклеозидов используются в одной стороны, позволяет эффективно доставлять молекулу в клетки, а с другой, улучшать фармакокинетические характеристики препарата за счет более медленного высвобождения активного компонента [32-39]. Недавно мы синтезировали ряд водорастворимых форм 5-модифицированных пиримидиновых 2'-дезоксинуклеозидов. Они оказались как минимум на два порядка лучше растворимыми по сравнению с исходными формами. Полученные соединения были активны против ряда грамположительных бактерий (MIC 20-95 мкг/мл), включая лекарственно-устойчивые штаммы Staphylococcus aureus и M. smegmatis, обладали низкой цитотоксичностью в отношении клеточных линий человека (CD₅₀ ≥ 100 мкг/мл) [40, 41]. Настоящая работа посвящена изучению химической и ферментативной стабильности синтезированных соединений с целью определения возможного механизма их действия для подтверждения нашей гипотезы о том, что они являются

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

депо-формами.

Исследуемые соединения синтезированы согласно разработанным нами ранее методам [31, 40, 41].

Идентификацию продуктов гидролиза проводили методом хромато-масс-спектрометрии. Массспектры высокого разрешения регистрировали на приборе Bruker Daltonics micrOTOF-Q II методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных ионах в соответствии с применяемыми ранее условиями [42].

Количественный анализ смеси пролуктов гилролиза проводили методом тонкослойной хроматографии (TCX) на пластинках Kieselgel 60 F254 ("Merck", Германия) в системах хлороформ- этанол 9 : 1 (система A), диоксан—аммиак (25% водн.) 4:1 (система Б) или диоксан-аммиак (25% водн.)вода 6 : 1 : 4 (система В). Анализ ТСХ проводили на приборе ChemiDoc Imaging System ("Bio-Rad", США). Результаты обрабатывали с помощью программы Image Lab Software 6.1 ("Bio-Rad"). Средние значения и стандартные отклонения, приведенные на диаграммах, получали исходя из трех независимых экспериментов. Экспериментальные данные, полученные в программе Image Lab, анализировали с применением программного обеспечения Excel.

Растворимость соединений определяли путем перемешивания на магнитной мешалке 20 мг соединения в 3 мл воды в течение 24 ч. Осадок отделяли центрифугированием (10 мин, 14000 об./мин).

качестве противоопухолевых, противовирусных и, в значительно меньшей степени, противогрибковых препаратов [3–8]. В то же время обнаружена антибактериальная активность нуклеозидов, что привело к активному развитию этой области [9-13]. Только в начале XXI века появились сообщения о нескольких группах модифицированных нуклеозидов, обладающих заметным антимикобактериальным действием in vitro [13-18]. В частности, 5-модифицированные пиримидиновые нуклеозиды с протяженными 1-алкинильными, алкилоксиметильными и алкилтриазолилметильными заместителями обладают ингибирующей активностью *in vitro* в отношении ряда микобактерий (M. tuberculosis, M. avium и *M. bovis*) [19-27]. Несмотря на интенсивные исследования, биологические мишени и механизм действия соединений этой группы пока окончательно не выявлены. В работах бельгийских ученых показано, что 5'-монофосфаты 5-модифицированных 2'-дезоксиуридинов эффективно ингибируют флавин зависимую тимидилатсинтазу ThyX M. tuberculosis [КФ 2.1.1.148] (уникальный фермент микобактерий), практически не взаимодействуя с основным бактериальным ферментом ThyA (близким к эукариотическим тимидилатсинтазам) [28-31]. В связи с этим можно предположить, что одной из возможных мишеней 5-модифицированных 2'-дезоксиуридинов может быть этот фермент [28-31]. С другой стороны, нами показано, что неспособные к фосфорилированию 5'-иодо-, азидо- и аминопроизводные 5-додецилоксиметил-2'-дезоксиуридина [24] и 5-замещенные карбоциклические 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидро-5'-норуридины с протяженными 1-алкинильными [25], алкилоксиметильными и алкилтриазолилметильными [26, 27] заместителями обладают значительной ингибирующей активностью in vitro в отношении M. tuberculosis, связанной с разрушением клеточной стенки микобактерии [26, 27]. Таким образом, можно предположить несколько механизмов действия модифицированных уридинов в отношении M. tuberculosis. Серьезную проблему при изучении биологиче-

Серьезную проблему при изучении биологических свойств модифицированных нуклеозидов, проявляющих противобактериальную и/или противовирусную активность, представляет их низкая растворимость в воде. Для решения этой задачи необходимо ввести в состав молекулы гидрофильные группировки, синтезируя так называемые депо-формы ("пролекарства"), с помощью которых можно модулировать фармакокинетику, фармакодинамику и токсичность препарата. Термин депоформа означает биологически инертное или слабо активное соединение, содержащее исходное лекарКонцентрацию вещества определяли, измеряя УФ-поглощение полученного раствора.

Химический гидролиз соединений и гидролиз соединений в сыворотке крови человека проводили в соответствии с разработанными ранее условиями [43].

Ферментативный гидролиз соединений проводили карбоксилэстеразой из свиной печени [КФ 3.1.1.1] ("Sigma-Aldrich", лиофилизат, ≥15 ед./мг).

Химический гидролиз соединений. К 100 мкл раствора нуклеозида (40 мМ) в ДМСО добавляли 1.9 мл растворов, содержащих 0.2 М глицин + 0.2 М HCl-буфер (pH 2.2), или 0.1 М калий-фосфатный буфер (pH 7.5), или 0.2 М глицин + 0.2 М NaOHбуфер (pH 9.0), и инкубировали в течение 24 ч при 37°С. Аликвоты (0, 0.5, 2, 4, 8, 12, 16, 24 ч) анализировали с помощью TCX (в системе A).

Гидролиз соединений в сыворотке крови человека. В сыворотку крови человека (100%, 196 мкл) добавляли 4 мкл раствора изучаемых соединений (20 мМ) в ДМСО. Смесь инкубировали в течение 24 ч при 37°С. Аликвоты (15 мкл) отбирали через определенные промежутки времени, добавляли этанол (60 мкл), смесь выдерживали в течение 20 мин при -20° С и центрифугировали (10 мин, 14000 об./мин). Отбирали супернатант и выпаривали его до получения сухого остатка. Полученные остатки растворяли в этаноле (10 мкл) и анализировали методами хромато-масс-спектрометрии и TCX в системах А для производных нуклеозидов, Б и В для производных нуклеотидов.

Ферментативный гидролиз соединений. Карбоксилэстеразу (5 ед.) растворяли в 28 мкл буферной смеси №1 (25 мМ Трис-НСІ, 50 мМ КСІ, рН 8.0). Затем к полученному раствору добавляли 5 мкл раствора изучаемых соединений (20 мМ) в этаноле, 40 мкл буферной смеси № 2 (50 мМ Трис-HCl, 6 мМ CaCl₂, 350 мМ NaCl, pH 7.6) и 127 мкл H₂O. Полученную реакционную смесь инкубировали при 37°С в течение 3 ч. Аликвоты (15 мкл) отбирали через определенные промежутки времени, добавляли этанол (60 мкл), смесь выдерживали в течение 20 мин при -20°C и центрифугировали (10 мин, 14000 об./мин). Отбирали супернатант и выпаривали его до получения сухого остатка. Полученные остатки растворяли в этаноле (10 мкл) и анализировали методами хромато-масс-спектрометрии или ТСХ в системе А.

Гидролиз соединений 1с и 5с при инкубировании с *Staphylococcus aureus* FDA 209P. Соединения 1с и 5с (3.3 мг) растворяли в смеси MeOH : H₂O 1 : 1 (5 мл) и 180 мкл смеси добавляли к 2820 мкл модифицированной питательной среды № 2 Гаузе, инфицированной *S. aureus* FDA 209P (10⁶ клеток/мл). Пробы инкубировали при 37°С, отбирая аликвоты (300 мкл) в 0, 1, 2, 4 и 8 ч, после чего выдерживали во льду в течение 5 мин и отделяли супернатант центрифугированием (13000 об./мин, 5 мин,

Eppendorf). К отобранному супернатанту (300 мкл) добавляли 1 мл этанола и выдерживали в течение 20 мин при -20° С. Далее полученную суспензию центрифугировали в тех же условиях, отбирали супернатанты и выпаривали их до получения сухого остатка, который растворяли в этаноле (20 мкл) и анализировали с помощью хромато-масс-спектрометрии или ТСХ. К осадкам, содержащим бактериальные клетки, добавляли по 100 мкл водного раствора лизоцима с концентрацией 10 мкг/мкл, встряхивали на вортексе в течение 1 мин и помещали в термостат с температурой 37°С на 30 мин. Полное разрушение клеток стафилококка было подтверждено после завершения инкубирования путем микроскопирования. В пробирки вносили по 800 мкл этанола, выдерживали в течение 20 мин при -20°C, отделяли супернатант центрифугированием в описанном режиме и анализировали по приведенной выше методике.

Компьютерное моделирование связывания 5'-Ои З'-О-(триэтиленгликоль)карбонил-5-додецилоксиметил-2'-дезоксиуридина (5с и 1с) и dUMP с белком (ThyX). Связывание 5с и 1с с белком ThyX изучали на его структуре. полученной с разрешением 2.01 Å (идентификатор PDB – 2AF6 [44]). В качестве исходной брали геометрию комплекса ThyX с 5'-монофосфатом 5-додецилоксиметил-2'-дезоксиуридина, полученную в [31]. На основе этой же работы применили процедуру пошагового наращивания звеньев фрагмента каждого соединения – 5с или 1с. В результате получили структуры комплексов 5с и 1с с активным центром ThyX и определили их энергии. Далее определили структуры и энергии этих комплексов, когда 5с и 1с удалены более чем на 15 Å от ThyX. Разность этих энергий и энергий 5с и 1с в активном центре ThyX интерпретировали как искомые энергии связывания.

Использование системы параметров MMFF94x [45] и критериев окончания расчетов в программе Molecular Operating Environment (MOE) версии 2009.10 [46] подробно описаны в [31].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отнесение противобактериальных модифицированных нуклеозидов к депо-формам требует, прежде всего, изучения их химической и ферментативной стабильности. С этой целью мы выбрали ряд модифицированных 2'-дезоксинуклеозидов, содержащих различные заместители как в пиримидиновом основании, так и в углеводном фрагменте молекулы (рис. 1).

Были исследованы 3'-*O*- и 5'-*O*-карбонилтрии тетраэтиленгликолевые производные 5-алкилоксиметил-2'-дезоксиуридина (3': **1а–с**, **2с** и 5': **5а–с**, **6с**), 3'-*O*- и 5'-*O*-карбонилтри- и тетраэтиленгликолевые производные 5-(4-алкилтриазол-









 $R = a) C_{10}H_{21}$ b) C₁₁H₂₃ c) C₁₂H₂₅



Рис. 1. Исследованные соединения.

R



Рис. 2. Исходные 5-модифицированные производные 2'-дезоксиуридина.

1-ил)метил-2'-дезоксиуридина (3': **3а**-с и **4а** и 5': **7а, с, 8а**), 3'-*O*-карбонилтриэтиленгликолевые производные N⁴-алкил-2'-дезокси-5-метилцитидина (**9а, с**), 3'-*O*-(триэтиленгликоль)карбонил-4тио-5-ундецилоксиметил-2'-дезоксиуридин (**10b**), 3'-(триэтиленгликоль)карбониламино-5-додецилоксиметил-2',3'-дидезоксиуридин (**11c**), 3'-*O*-(6-гидроксигексилоксикарбонил)-5-ундецилоксиметил-2'-дезоксиуридин (**12b**), 3'-*O*-(6-аминогексилоксикарбонил)-5-ундецилоксиметил-2'-дезоксиуридин (**13b**) и также 5'-монофосфаты 5-алкилоксиметил-2'-дезоксиуридина (**14а**-с) и 5-(4-алкилтриазол-1-ил)метил-2'-дезоксиуридина (**15а, с**).

При изучении стабильности гликолевых производных модифицированных нуклеозидов в качестве контролей использовали 3',5'-диацетат тимидина и 5'-монофосфат тимидина, а при исследовании стабильности 5'-монофосфатов модифицированных нуклеозидов применяли 5'- монофосфаты тимидина и 5-азидометил-2'-дез-оксиуридина (16).

Как сказано во введении, растворимость депоформ изученных модифицированных пиримидиновых 2'-дезоксинуклеозидов (рис. 2) в воде была лучше, чем у исходных соединений.

В табл. 1 в качестве примера приведены растворимости в воде исходных 5-модифицированных производных 2'-дезоксиуридина и их 5'-триэтиленгликолевых производных.

Химическая и ферментативная стабильность

Стабильность соединений в буферных растворах и в сыворотке крови человека оценивали, используя метод [43]. Все изученные производные нуклеозидов были устойчивы в буферных растворах при двух значениях pH: 2.2 и 7.5 – и незначительно гидролизовались при pH 9.0. Это указывает на химическую стабильность исследованных

Таблица 1. Значения растворимости в воде некоторых гликолевых производных 5-модифицированных 2'-дезок-сиуридинов

Nº	Заместитель при нуклеиновом основании	Заместитель при углеводном фрагменте	Раствори- мость, мг/мл	№	Заместитель при нуклеиновом основании	Заместитель при углеводном фрагменте	Раствори- мость, мг/мл
17a	$5-CH_2-OC_{10}H_{21}$	-	0.028	18a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁	-	0.01
17b	$5-CH_2-OC_{11}H_{23}$	-	0.017	18c	5-CH ₂ -TriC ₁₂ H ₂₅	_	0.005
17c	$5-CH_2-OC_{12}H_{25}$	_	0.009	3a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁ ***	3'-O-C(O)TEG	1.25
1a	$5-CH_2-OC_{10}H_{21}$	3'-O-C(O)TEG*	4.46	3c	$5\text{-}CH_2\text{-}TriC_{12}H_{25}$	3'-O-C(O)TEG	0.78
1b	$5-CH_2-OC_{11}H_{23}$	3'-O-C(O)TEG	3.61	7a	$5-CH_2-TriC_{10}H_{21}$	5'-O-C(O)TEG	2.82
1c	$5-CH_2-OC_{12}H_{25}$	3'-O-C(O)TEG	1.3	7c	5-CH ₂ -TriC ₁₂ H ₂₅	5'-O-C(O)TEG	1.18
5a	$5-CH_2-OC_{10}H_{21}$	5'-O-C(O)TEG	5.5	4 a	$5-CH_2-TriC_{10}H_{21}$	3'-O-C(O)TetEG	2.14
5b	$5-CH_2-OC_{11}H_{23}$	5'-O-C(O)TEG	2.26	8a	$5-CH_2-TriC_{10}H_{21}$	5'-O-C(O)TetEG	4.36
5c	$5-CH_2-OC_{12}H_{25}$	5'-O-C(O)TEG	0.85				

* TEG – триэтиленгликоль.

** TetEG – тетраэтиленгликоль.

*** Tri – 1,2,3-триазолил-.

соединений, и их гидролиз в сыворотке крови был практически полностью ферментативным.

Оптимальное время полугидролиза депо-форм составляет 5-12 ч, согласно [47]. Практически все полученные гликолевые производные, за исключением 3'-О-карбонилтриэтиленгликолевых производных N⁴-алкил-2'-дезокси-5-метилцитидина (9а. с) и 3'-О-(триэтиленгликоль)карбониламино-5-додецилоксиметил-2',3'-дидезоксиуридина (11с), имели оптимальное время полугидролиза 2-12 ч (табл. 2) и расщеплялись только до исходных 5-модифицированных нуклеозидов. Наличие более протяженного алкильного или гликолевого заместителя обычно увеличивало время гидролиза.

На рис. 3 в качестве примера представлена диаграмма гидролиза 3'-О-(триэтиленгликоль)карбонил-5-додецилоксиметил-2'-дезоксиуридина 1с в сыворотке крови человека, из которой следует, что время полугидролиза ($t_{1/2}$) **1с** с образованием "родительского" 5-додецилоксиметил-2'-дезоксиуридина 17с (Схема 1) составляет 4 ± 0.5 ч.

Время полугидролиза соединений 1с и 5с карбоксилэстеразой составило 60 ± 10 мин (рис. 4).

Гидролиз соединений 1с и 5с при инкубании c S. aureus 209P

Изучение пролуктов метаболизма 1с и 5с показало, что родительский нуклеозид 5-додецилоксиметил-2'-дезоксиуридин 17с образуется при инкубации соединений 1с и 5с (в концентрациях, соответствующих 1/2 МПК) в инкубационной среде, содержащей S. aureus FDA 209Р. Обнаружено, что после инкубации в течение 8 ч конверсия 1с и 5с в родительский нуклеозид 17с составляет около 30% как внутри бактерий, так и в инкубационной среле.

Компьютерное моделирование соединений 1с и 5с с активным центром ThvX

Как сказано выше, данные об эффективном ингибировании микобактериальной флавинзависимой тимидилатсинтазы ThyX 5'-монофосфатами 5-модифицированных 2'-дезоксиуридинов

№	Заместитель при нуклеиновом основании	Заместитель при углеводном фрагменте	$t_{1/2}$ (4 ± 0.5)	Nº	Заместитель при нуклеиновом основании	Заместитель при углеводном фрагменте	$t_{1/2}$ (ч ± 0.5)
1a	5-CH ₂ -OC ₁₀ H ₂₁	3'-O-C(O)TEG*	2	8 a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁	5'-O-C(O)TetEG	12
1b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	3'-O-C(O)TEG	3	9a	4-NHC ₁₀ H ₂₁	3'-O-C(O)TEG	>24
1c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	3'-O-C(O)TEG	4	9c	4-NHC ₁₂ H ₂₅	3'-O-C(O)TEG	>24
5a	5-CH ₂ -OC ₁₀ H ₂₁	5'-O-C(O)TEG	3	10b	4-S 5-CH ₂ –OC ₁₁ H ₂₃	3'-O-C(O)TEG	6
5b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	5'-O-C(O)TEG	3	11c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	3'-NH-C(O)TEG	>24
5c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	5'-O-C(O)TEG	5	12b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	3'-O– C(O)OC ₆ H ₁₂ OH	14
2c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	3'-O-C(O)TetEG**	7	13b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	3'-O- C(O)OC ₆ H ₁₂ NH ₂	16
6c	5-CH ₂ -OC ₁₂ H ₂₅	5'-O-C(O)TetEG	8	1 4 a	5-CH ₂ -OC ₁₀ H ₂₁	5'-O-P(O)(OH) ₂	>12
3a	5-CH ₂ -TriC ₁₀ H ₂₁ ***	3'-O-C(O)TEG	6	14b	5-CH ₂ -OC ₁₁ H ₂₃	5'-O–P(O)(OH) ₂	>12
3c	$5-CH_2-TriC_{12}H_{25}$	3'-O-C(O)TEG	8	14c	$5-CH_2-OC_{12}H_{25}$	5'-O-PO(OH) ₂	>12
7a	$5\text{-}CH_2\text{-}TriC_{10}H_{21}$	5'-O-C(O)TEG	7	15a	$5\text{-}CH_2\text{-}TriC_{10}H_{21}$	5'-O–P(O)(OH) ₂	9
7c	$5-CH_2-TriC_{12}H_{25}$	5'-O-C(O)TEG	5	15c	$5\text{-}CH_2\text{-}TriC_{12}H_{25}$	5'-O–P(O)(OH) ₂	11
4 a	$5-CH_2-TriC_{10}H_{21}$	3'-O-C(O)TetEG	10	16	5-CH ₂ N ₃	5'-O–P(O)(OH) ₂	1.5
TMP	_	5'-O-P(O)(OH) ₂	40 ± ± 10 мин.	Ac ₂ T	_	3'-OAc 5'-OAc	3
* ТЕС – триэтиленгликоль							

Таблица 2. Значения времени полугидролиза соединений в сыворотке крови человека

** TetEG – тетраэтиленгликоль.

*** Tri – 1,2,3-триазолил-.



Рис. 3. Гидролиз соединения **1c** в сыворотке крови человека. По оси X отложено время отбора проб, по оси Y – количество вещества в процентах. Гидролиз проводилия в условиях, приведенных в Экспериментальной части (см. Гидролиз соединений в сыворотке крови человека).



Рис. 4. Ферментативный гидролиз соединения **1с** карбоксилэстеразой. По оси X отложено время отбора проб, по оси Y – количество вещества в процентах. Гидролиз проводили в условиях, приведенных в Экспериментальной части (см. Ферментативный гидролиз соединений).

[28—31] позволяют рассматривать данный фермент в качестве одной из мишеней ингибирующего действия 5-модифицированных 2'-дезоксиуридинов. С целью выявления возможности связывания полученных нами водорастворимых производных с ThyX проведен молекулярный докинг 5'-*O*- и 3'-*O*-(триэтиленгликоль)карбонил-5-додецилоксиметил-2'-дезоксиуридина (**5с** и **1с**, в качестве примера) с активным центром фермента и сравнение полученных энергий связывания ThyX с соединениями **5с**, **1с** и субстратом фермента — монофосфатом 2'-дезоксиуридина (dUMP). Результаты расчетов приведены в табл. 3, а геометрия полученных комплексов — на рис. 5.

Максимальные значения энергии связывания исследуемых аналогов с ThyX 77.1 и 50.1 ккал/моль, соответственно, что хуже энергии связывания с субстратом. Это свидетельствует о том, что дан-

Таблица 3. Энергия связывания соединений с активным центром флавинзависимой тимидилатсинтазы *M. tuberculosis* (белка ThyX)

Соединение	Субстрат dUMP [31]	Аналог 5с	Аналог 1с
Энергия связывания, ккал/моль	-189.4	-50.1	-77.1





Рис. 5. Расположение субстрата и его аналогов в активном центре ThyX. a - ThyX с субстратом, $\delta -$ ThyX с аналогом **1c**, e - ThyX с аналогом **5c**. Желтым цветом показаны субстрат и, соответственно, его аналоги **1c** и **5c**, кремовым – цепь A ThyX, зеленым – цепь B ThyX, бирюзовым – цепь C ThyX. FAD располагается на переднем плане каждого рисунка и поэтому изображен полупрозрачным.

ные аналоги, скорее всего, не являются ингибиторами ThyX.

Попытки оптимизации геометрии веществ в активном центре для увеличения энергии связывания исследуемых аналогов с ThyX не привели к существенному изменению энергии.

Сравнение положений субстрата, аналога **1с** и аналога **5с** относительно FAD и цепей A, B, C белка ThyX позволяет сделать следующие заключения. Как показано ранее, наличие длинного алифатического заместителя по положению 5 урацила обеспечивает дополнительный контакт этого заместителя с цепью B и не меняет расположение дезоксиуридинового фрагмента относительно FAD. Это обеспечивает успешное ингибирование ThyX 5'-монофосфатами 5-модифицированных пиримидиновых нуклеозидов с протяженными 1-алкинильными, алкилоксиметильными и алкилтриазолилметильными заместителями, отмечаемое в [28–31].

Появление объемного заместителя по положению 3'-дезоксиуридина приводит к существенному смещению всего аналога относительно FAD. Одновременно ослабляется контакт с цепью A и существенно возрастает контакт с цепью C.

Наконец, такой же заместитель в положении 5'-дезоксиуридина оставляет контакт FAD с урацильным остатком близким к контакту FAD с субстратом, но, одновременно, усиливает контакт аналога с цепью А.

Из этого можно заключить, что контакт 5'-заместителя с цепью А оказывается энергетически невыгодным и, несмотря на остальные относительно удачные контакты, приводит к практически нулевому связыванию аналога **5с** в активном центре ThyX.

Взаимодействие З'-заместителя с цепью С не является столь же невыгодным, как взаимодействие с цепью А, но сопровождающие его изменения в расположении аналога **1c** относительно активного центра фермента (и FAD) все же приводят к уменьшению энергии связывания ThyX и **1c** настолько, что он является плохим ингибитором этого фермента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Кризис антибиотикотерапии, обусловленный резистентностью патогенов к одобренным антибактериальным препаратам, привел к необходимости создания принципиально новых малотоксичных веществ - эффективных ингибиторов лекарственно-устойчивых штаммов патогенов. Очевидно, что для получения лекарственных форм таких соединений желательно, чтобы они были растворимы в воде. Дизайн депо-формы представляет собой широко используемую стратегию молекулярной модификации, которая направлена на оптимизацию физико-химических и фармакологических свойств лекарств, для улучшения их растворимости и фармакокинетических свойств и, зачастую, снижения их токсичности [33, 37]. Как указывалось выше, предложен ряд способов получения депо-форм соединений [32, 35-43, 48, 49]. В качестве пероральных пролекарств хорошо зарекомендовали себя аминокислотные (в первую очередь валиновые) эфиры нуклеозидов [50-52].

Другой подход к повышению растворимости биологически активных нуклеозидов – синтез их 5'-фосфатных или 5'-фосфонатных производных, которые под действием клеточных ферментов гидролизуются с постепенным образованием активного нуклеозидного ингибитора. В качестве примера можно привести 5'-фосфонатные гомои гетеродимеры нуклеозидов с противовирусной и противобактериальной активностью [41, 53] или применяемый в терапии онкологических заболеваний 5'-фосфат 2-фторарааденозина (флударабин) [54], а также созданные в нашей лаборатории 5'-Н-фосфонат 3'-азидо-3'-дезокситимидина (никавир), используемый в России для лечения инфицированных вирусом иммунодефицита человека [55], и 5'-Н-фосфонат 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидина [49].

Мы воспользовались этими подходами для синтеза растворимых производных полученных нами ранее нуклеозидов, проявляющих противобактериальную активность.

Известно, что оптимальное время полугидролиза лепо-форм в сыворотке крови человека составляет от 3 до 12 ч [47]. Синтезированные нами 5'-монофосфаты 5-алкилоксиметил-2'-дезоксиуридина (14а-с) оказались довольно устойчивыми к ферментативному гидролизу (время полугидролиза в сыворотке крови человека >12 ч), в то время как 5'-монофосфаты 5-(4-алкилтриазол-1ил)метил-2'-дезоксиуридина (15а,с) имели оптимальное время полугидролиза (t_{1/2}: 3-11 ч). Для сравнения: t_{1/2} 5'-монофосфатов тимидина и 5-азидометил-2'-дезоксиуридина (16) в этих условиях составляет 40 и 90 мин соответственно. Однако применение 5'-монофосфатов в большинстве случаев ограничено неспособностью заряженных соединений проникать через клеточную стенку бактерий [23, 56].

Более перспективным нам представляется применение в качестве депо-форм 3'-О- и 5'-Окарбонилтри- и тетраэтиленгликолевых производных нуклеозидов. Как сказано во введении и показано в нашей работе (табл. 1), растворимость депо-форм изученных модифицированных пиримидиновых 2'-дезоксинуклеозидов оказалась, как минимум, на два порядка лучше чем у исходных форм (для примера, 8.5 мг/мл у 3'-триэтиленгликолевого производного **5с** и 13 мг/мл у 5'-производного по сравнению с 0.09 мг/мл у исходного 5додецилоксиметил-2'-дезоксиуридина **17с**, табл. 1) При этом растворимость 3'- и 5'-производных различалась незначительно, а замена триэтиленгиколевого фрагмента на тетраэтиленгликолевый приводила к двукратному улучшению растворимости, например, 2.14 у триэтиленгликолевого производного **4a** и 4.36 у тетраэтиленгликолевого производного **8a**.

Практически все полученные соединения, за исключением N^4 -алкил-5-метил-2'-дезоксицитидинов (**9а**, **c**) и 3'-(триэтиленгликоль)карбониламино-5-додецилоксиметил-2',3'-дидезоксиуридина (**11c**), имели время полугидролиза 2—12 ч (табл. 2) и расщеплялись только до исходных нуклеозидов, что соответствует поставленной нами цели. Стоит отметить, что соединения оказались стабильными в буферных растворах с незначительным гидролизом при pH 9.0 и эффективно гидролизовались карбоксилэстеразой (рис. 4), что указывает на ферментативную природу гидролиза в сыворотке крови.

Эти наблюдения также подтверждают, что карбонатные и карбаматные группы в депо-формах соединений отличаются по прочности связи. Оксикарбонильная связь в них не равноценна связи в природных сложных эфирах, однако ее гидролиз в сыворотке крови, вероятно, также осуществляется карбоксилэстеразами в соответствии со схемой 1, но лишь в случае карбонатов, что объясняет сильно различающиеся времена полугидролиза соединений **11с** и **1с** в сыворотке крови человека.



Схема 1. Предполагаемый механизм гидролиза водорастворимых форм нуклеозидов (на примере 1с).

Из табл. 2 следует, что карбонилтри- и тетраэтиленгликолевые производные различаются по скорости гидролиза в сыворотке крови (тетраэтилегликолевые производные гидролизуются медленнее). С другой стороны, замена гликолевого фрагмента на гидроксигексильный или аминогексильный

приводила к значительному увеличению времени гидролиза соединений **12b** и **13b** ($t_{1/2} = 14$ и 16 ч соответственно).

На устойчивость соединений к гидролизу влияет также модификация нуклеинового основания, например, замена атома кислорода в 4-м положении в соединении **1b** на атом серы **10b** приводила к двукратному увеличению времени гидролиза ($t_{1/2} =$ = 3 и 6 ч соответственно). Наблюдается также зависимость стабильности гликолевых производных от размера заместителя в позиции 5 основания. Как правило, соединения с более протяженными углеводородными заместителями имеют большее время гидролиза. С другой стороны, нахождение гликолевых заместителей в 3'- или 5'-положении углеводного фрагмента не влияет существенно на устойчивость гликолевых производных.

Среди всех исследованных соединений, три- и тетраэтиленгликолевые производные 5-додецилоксиметил-2'-дезоксиуридина **1с, 2с, 5с** и **6с** представляются наиболее перспективными для использования в качестве депо-форм, поскольку обладают как оптимальным временем полугидролиза (4–8 ч), так и заметно увеличенной растворимостью в воде (8.5–13 мг/мл по сравнению с 0.09 мг/мл у исходного соединения).

Результаты теоретических расчетов связывания 5'-О- и 3'-О-(триэтиленгликоль)карбонил-5додецилоксиметил-2'-дезоксиуридина (5с и 1с) с флавинзависимой тимидилатсинтазой *M. tuberculosis* (белком ThyX) в сравнении с природным субстратом dUMP позволяют предположить, что эти аналоги 5с и 1с не являются ингибиторами ThyX, поскольку значение энергии связывания с исследуемыми аналогами значительно хуже энергии связывания с субстратом. Можно предположить, что проникшие в клетку соединения должны подвергаться расщеплению эстеразами, а уже затем связываться с предполагаемой мишенью ThyX, как это, собственно, и следует из самой концепции депо-формы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные (результаты ферментативного гидролиза и теоретические расчеты) позволяют со значительной долей уверенности утверждать, что синтезированные нами хорошо растворимые в водно-органических средах карбонилтри- и тетраэтиленгликолевые производные и 5'-монофосфаты модифицированных нуклеозидов являются депо-формами нуклеозидов, обладающих противобактериальной активностью. Показана перспективность создания подобных производных нуклеозидов для получения эффективных ингибиторов роста микроорганизмов.

Авторы благодарны М.К. Кухановой (ИМБ РАН) за ценные советы и помощь в работе.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 20-04-01085, 20-04-00094, 20-34-90056, 17-00-00393 и 18-29-08010) и Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (№ 01201363818).

В настоящей работе не использовали людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Ventola C.L. (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P&T.* **40**, 277–283.
- Brown E.D., Wright G.D. (2016) Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. 529, 336–343.
- 3. 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**, 447–464.
- Matsuda A., Sasaki T. (2004) Antitumor activity of sugarmodified cytosine nucleosides. *Cancer Sci.* 95, 105–111.
- 5. De Clercq E. (2012) Human viral diseases: what is next for antiviral drug discovery? *Curr. Opin. Virol.* **2**, 572–579.
- 6. De Clercq E., Li G. (2016) Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**. 695–747.
- Winn M., Goss R.J.M., Kimura K., Timothy D.H., Bugg T.D.H. (2010) Antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall assembly: recent advances in structure-function studies and nucleoside biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 27, 279–304.
- 8. Yssel A.E.J., Vanderleyden J., Steenackers H.P. (2017) Repurposing of nucleoside- and nucleobase-derivative drugs as antibiotics and biofilm inhibitors. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 2156–2170.
- Cui Z., Wang X., Koppermann S., Thorson J.S., Ducho C., Van Lanen S.J. (2018) Antibacterial muraymycins from mutant strains of *Streptomyces* sp. NRRL 30471. *J. Nat. Prod.* 81. 942–948.
- Abbas M., Elshahavi S.I., Wang X., Ponomareva L.V., Sajid I., Shaaban K.A., Thorson J.S. (2018) Puromycins B-E, naturally occurring amino-nucleosides produced by the Himalayan isolate *Streptomyces* sp. PU-14G. J. Nat. Prod. 81, 2560–2566.
- Seydlova G., Pohl R., Zbornikova E., Ehn M., Simak O., Panova N., Kolar M., Bogdanova K., Vecerova R., Fiser R., Sanderova H., Vitovska D., Sudzinova P., Pospisil J., Benada O., Krizek T., Sedlak D., Bartunek P., Krasny L., Rejman D. (2017) Lipophosphonoxins II: design, synthesis, and properties of novel broad spectrum antibacterial agents. J. Med. Chem. 60, 6098 6118.
- Bockman M.R., Engelhart C.A., Dawadi S., Larson P., Tiwari D., Ferguson D.M., Schnappinger D., Aldrich C.C. (2018) Avoiding antibiotic inactivation in *Mycobacterium tuberculosis* by Rv3406 through strategic nucleoside modification. *ACS Infect. Dis.* 4, 1102–1113.
- 13. Serpi M., Ferrari V., Pertusati F. (2016) Nucleoside derived antibiotics to fight microbial drug resistance: new

utilities for an established class of drugs? *J. Med. Chem.* **59**, 10343–10382.

- Van Calenbergh S., Pochet S., Munier-Lehmann H. (2012) Drug design and identification of potent leads against *Mycobacterium tuberculosis* thymidine monophosphate kinase. *Curr. Top. Med. Chem.* 12, 694–705.
- 15. Duckworth B.P., Nelson K.M., Aldrich C.C. (2012) Adenylating enzymes in *Mycobacterium tuberculosis* as drug targets. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 766–796.
- Duckworth B.P., Wilson D.J., Nelson K.M., Boshoff H.I., Barry C.E. 3rd, Aldrich C.C. (2012) Development of a selective activity-based probe for adenylating enzymes: profiling MbtA involved in siderophore biosynthesis from *Mycobacterium tuberculosis*. ACS Chem. Biol. 7, 1653–1658.
- Шмаленюк Э.Р., Кочетков С.Н., Александрова Л.А. (2013) Новые ингибиторы роста *M. tuberculosis* на основе модифицированных пиримидиновых нуклеозидов и их аналогов. *Успехи химии.* 82, 896–915.
- Ferrari V., Serpi M. (2015) Nucleoside analogs and tuberculosis: new weapons against an old enemy. *Future Med. Chem.* 7, 291–314.
- Rai D., Johar M., Manning T., Agrawal B., Kunimoto D.Y., Kumar R. (2005) Design and studies of novel 5-substituted alkynylpyrimidine nucleosides as potent inhibitors of mycobacteria. J. Med. Chem. 48, 7012– 7017.
- Johar M., Manning T., Tse C., Desroches N., Kunimoto D.Y., Agrawal B., Kumar R. (2007) Growth inhibition of *Mycobacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis* and Mycobacterium avium in vitro: effect of 1-beta-D-2'-arabinofuranosyl and 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-2'-ribofuranosyl) pyrimidine nucleoside analogs. J. Med. Chem. 50, 3696–3705.
- Srivastav N.C., Manning T., Kunimoto D.Y., Kumar R. (2007) Studies on acyclic pyrimidines as inhibitors of mycobacteria. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 2045–2053.
- Srivastav N.C., Manning T., Kunimoto D.Y., Kumar R. (2006) *In vitro* anti-mycobacterial activities of various 2'-deoxyuridine, 2'-arabinouridine and 2'-arabinofluoro-2'-deoxyuridine analogues: synthesis and biological studies. *Med. Chem.* 2, 287–293.
- Александрова Л.А., Шмаленюк Э.Р., Кочетков С.Н., Ерохин В.В., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Черноусова Л.Н. (2010) Новые 5-модифицированные пиримидиновые нуклеозиды – ингибиторы роста микобактерий. *Acta Naturae*. 1, 115–118.
- Shmalenyuk E.R., Chernousova L.N., Karpenko I.L., Kochetkov S.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Efremenkova O.V., Alexandrova L.A. (2013) Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv and MDR MS-115 by a new set of C5 modified pyrimidine nucleosides. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 4874–4884.
- Matyugina E., Khandazhinskaya A., Chernousova L., Andreevskaya S., Smirnova T., Chizhov A., Karpenko I., Kochetkov S., Alexandrova L. (2012) The synthesis and antituberculosis activity of 5'-nor carbocyclic uracil derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 6680–6686.
- Khandazhinskaya A.L., Alexandrova L.A., Matyugina E.S., Solyev P.N., Efremenkova O.V., Buckheit K.W., Wilkinson M., Buckheit Jr. R.W., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Kochetkov S.N.,

Seley-Radtke K.L. (2018) Novel 5'-norcarbocyclic pyrimidine derivatives as antibacterial agents. *Molecules*. **23**, pii: E3069.

- Khandazhinskaya A.L, Matyugina E.S., Alexandrova L.A., Kezin V.A., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Popenko V.I., Leonova O.G., Kochetkov S.N. (2020) Interaction of 5-substituted pyrimidine nucleoside analogues and *M. tuberculosis*: a view through an electron microscope. *Biochimie*. 171–172, 170–177.
- Kögler M., Vanderhoydonck B., De Jonghe S., Rozenski J., Van Belle K., Herman J., Louat T., Parchina A., Sibley C., Lescrinier E., Herdewijn P. (2011) Synthesis and evaluation of 5-substituted 2'-deoxyuridine monophosphate analogues as inhibitors of flavin-dependent thymidylate synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* 54, 4847–4862.
- Kögler M., Busson R., De Jonghe S., Rozenski J., Van Belle K., Louat T., Munier-Lehmann H., Herdewijn P.S. (2012) Synthesis and evaluation of 6-aza-2'-deoxyuridine monophosphate analogs as inhibitors of thymidylate synthases, and as substrates or inhibitors of thymidine monophosphate kinase in *Mycobacterium tuberculosis. Chem. Biodiv.* 9, 536–556.
- Parchina A., Froeyen M., Margamuljana L., Rozenski J., De Jonghe S., Briers Y., Lavigne R., Herdewijn P., Eveline Lescrinier E. (2013) Discovery of an acyclic nucleoside phosphonate that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* ThyX based on the binding mode of a 5-alkynyl substrate analogue. *ChemMedChem.* 8, 1373– 1383.
- Alexandrova L.A., Chekhov V.O., Shmalenyuk E.R., Kochetkov S.N., Abu El-Asrar R., Herdewijn P. (2015) Synthesis and evaluation of C-5 modified 2'-deoxyuridine monophosphates as inhibitors of *M. tuberculosis* thymidylate synthase. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 7131– 7137.
- Rautio J., Kumpulainen H., Heimbach T., Oliyai R., Oh D., Järvinen T., Savolainen J. (2008) Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 255–270.
- Huttunen K., Raunio H., Rautio J. (2011) Prodrugs from serendipity to rational design. *Pharmacol. Rev.* 63, 750–771.
- Stella V.J., Nti-Addae K.W. (2007) Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 677–694.
- Beaumont K., Webster R., Gardner I., Dack K. (2003) Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug Metab.* 4, 461–485.
- Testa B. (2009) Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 338–344.
- Jornada D.H., Dos Santos Fernandes G.F., Chiba D.E., De Melo T.R.F., Dos Santos J.L., Chung M.C. (2016) The prodrug approach: a successful tool for improving drug solubility. *Molecules*. 21. https://doi.org/10.3390/molecules21010042
- Mori G., Chiarelli L.R., Riccardi G., Pasca M.R. (2017) New prodrugs against tuberculosis. *Drug Discov. Today*. 22, 519–525.

- Pochet S., Kansall V., Destouesse F., Sarfatil S.R. (1990) Alkylglycoside carbonates of 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Tetrahedron Lett.* 31, 6021–6024.
- Negrya S.D., Jasko M.V., Solyev P.N., Karpenko I.L., Efremenkova O.V., Vasilyeva B.F., Sumarukova I.G., Kochetkov S.N., Alexandrova L.A. (2020) Synthesis of water-soluble prodrugs of 5-modified 2'-deoxyuridines and their antibacterial activity. J. Antibiotics. 73, 236– 246.
- Alexandrova L. Zicari S., Matyugina E., Khandazhinskaya A., Smirnova T., Andreevskaya S., Chernousova L., Vanpouille C., Kochetkov S., Margolis L. (2017) Dual-targeted anti-TB/anti-HIV heterodimers. *Antiviral Res.* 145, 175–183.
- 42. Александрова Л.А., Ефременкова О.В., Андронова В.Л., Галегов Г.А., Сольев П.Н., Карпенко И.Л., Кочетков С.Н. (2016) 5-(4-алкил-1,2,3-триазол-1ил)метильные производные 2'-дезоксиуридина – ингибиторы роста бактерий и вирусов. Биоорган. химия. 42, 746-754.
- 43. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A., Karpenko I.L., Zakirova N.F., Tarussova N.B., Krayevsky A.A. (2000) P-(alkyl)-nucleoside 5'-hydrogenphosphonates as depot forms of antiviral nucleotide analogues. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 19, 1795–1804.
- Sampathkumar P., Turley S., Ulmer J.E., Rhie H.G., Sibley C.H., Hol W.G. (2005) Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* flavin dependent thymidylate synthase (MtbThyX) at 2.0A resolution. *J. Mol. Biol.* 352, 1091–1104.
- Halgren T.A. (1999) MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies. J. Comput. Chem. 20, 720–729.
- 46. Chemical Computing Group Inc. Molecular Operating Environment (MOE) (2012). 10.
- 47. De Clercq E. (2001) Antiviral drugs: current state of the art. J. Clin. Vir. 22, 73–89.
- Solyev P.N., Shipitsin A.V., Karpenko I.L., Nosik D.N., Kalnina L.B., Kochetkov S.N., Kukhanova M.K., Jasko M.V. (2012) Synthesis and anti-HIV properties of

new carbamate prodrugs of AZT. *Chem. Biol. Drug Des.* **80**, 947–952.

- Khandazhinskaya A.L., Jasko M.V., Karpenko I.L., Solyev P.N., Golubeva N.A., Kukhanova M.K. (2011)
 5'-Phosphonated derivatives of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine as new anti-HIV prodrugs. *Chem. Biol. Drug Des.* 78, 50–56.
- McGuigan C., Pathirana R.N., Migliore M., Adak R., Luoni G., Jones A.T., Díez-Torrubia A., Camarasa M.J., Velázquez S., Henson G., Verbeken E., Sienaert R., Naesens L., Snoeck R., Andrei G., Balzarini J. (2007) Preclinical development of bicyclic nucleoside analogues as potent and selective inhibitors of varicella zoster virus. J. Antimicrob. Chemother. 60, 1316–1330.
- 51. McGuigan C., Balzarini J. (2009) FV100 as a new approach for the possible treatment of varicella-zoster virus infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 671–673.
- 52. Snoeck R., Andrei G., De Clercq E. (1994) Chemotherapy of varicella zoster virus infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **4**, 211–226.
- Solyev P.N., Jasko M.V., Karpenko I.L., Sharkin Y.A., Shipitsyn A.V., Kukhanova M.K. (2014) New dinucleoside phosphonate derivatives as prodrugs of 3'-azido-3'-deoxythymidine and β-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine: synthesis and anti-HIV properties. *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* 33, 64–79.
- Jain N., O'Brien S. (2015) Initial treatment of CLL: integrating biology and functional status. *Blood*. **126**, 463–470.
- Хандажинская А.Л., Широкова Е.А. (2013) 5'-Фосфонаты АZТ: достижения и перспективы в лечении и профилактике ВИЧ-инфекции. *Acta Naturae*. 5, 57–65.
- McGuigan C., Derudas M., Gonczy B., Hinsinger K., Kandil S., Pertusati F., Serpi M., Snoeck R., Andrei G., Balzarini J., McHugh T.D., Maitra A., Akorli E., Evangelopoulos D., Bhakta S. (2014) ProTides of N-(3-(5-(2'-deoxyuridine))prop-2-ynyl)octanamide as potential anti-tubercular and anti-viral agents. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 2816–2824.

GLYCOL AND PHOSPHATE DEPOT-FORMS OF 4- AND/OR 5-MODIFIED NUCLEOSIDES EXHIBITING ANTIBACTERIAL ACTIVITY

S. D. Negrya¹, M. V. Jasko¹, D. A. Makarov^{1,4}, P. N. Solyev¹, I. L. Karpenko¹, O. V. Shevchenko¹, O. V. Chekhov^{1,3}, A. A. Glukhova², B. F. Vasilyeva², T. A. Efimenko², I. G. Sumarukova², O. V. Efremenkova², S. N. Kochetkov¹, and L. A. Alexandrova^{1,*}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia ²Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

³Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia

⁴Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Higher Chemical College of Russian Academy of Sciences,

Moscow, 125047 Russia

*e-mail: ala2004_07@mail.ru

The emergence of resistance to most drugs used in infectious diseases treatment requires the creation of new compounds that are effective against drug-resistant strains of pathogens. Recently, we have synthesized several groups of modified nucleosides that showed significant antibacterial activity *in vitro*, however, their further studies were difficult to make due to the low solubility in water solutions. Thereby, we have synthesized compounds that are well soluble in water-organic solutions and appeared to be more effective inhibitors of

НЕГРЯ и др.

gram-positive bacteria and mycobacteria growth. We suggested that the water-soluble forms of modified nucleosides studied in this communication are their depot forms. To confirm this, we studied their ability to be hydrolyzed in various media and made molecular docking of the compounds into the active center of the proposed target protein ThyX. Computer modelling results showed that water-soluble analogs are presumably not ThyX inhibitors, which may confirm our assumption about the action of nucleoside derivatives as depot forms. The compounds were hydrolyzed both by porcine liver carboxyl esterase and in human serum, and upon incubation with *Staphylococcus aureus* 209P. The data obtained allow us to assert with considerable confidence that the studied compounds are depot forms of modified nucleosides.

Keywords: antibiotic resistance, antiviral and antibacterial activity, modified nucleosides and nucleotides, prodrug, depot-form of drug, thymidilate synthase of *M. tuberculosis*